



universität
wien

DIPLOMARBEIT

***In vitro*-Bioaktivität von zwei neu synthetisierten, möglichen H₂S-Donatoren (SWS8 HCl und SWS9 HCl)**

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser: Daniel Gjoncaj

Studienrichtung /Studienzweig Pharmazie

(lt. Studienblatt):

Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Christian R. Studenik

Wien, im Juni 2010

Auch eine schwere Tür hat nur einen kleinen Schlüssel nötig

Charles Dickens

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meiner großen Familie bedanken, die mich finanziell, geduldig, moralisch und liebevoll während meines gesamten Studiums begleitet hat. Mein spezieller Dank gilt meinen lieben Müttern, meinem Onkel und meiner Schwester ohne deren Hilfe ich es nie so weit gebracht hätte.

Des Weiteren gilt mein Dank meinem Bruder Georg Zimmerman für die technische Unterstützung beim Schreiben dieser Diplomarbeit.

Ein großes Dankeschön auch an meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao. Univ.-Prof. Dr. Christian R. Studenik für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, Geduld, Beratung und Großzügigkeit. Seine tatkräftige Unterstützung hat maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die tolle Zeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe des Departments für Medizinische/ Pharmazeutische Chemie für die Bereitstellung der Testsubstanzen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und Kollegen für die Stunden, die das Studium erst so richtig aufregend und interessant gemacht haben, bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Vasorelaxierender Effekt von H ₂ S als neuer gasförmiger endogener ATP abhängiger K- Kanalöffner	1
1.2 Schwefelwassertoff ist ein endogener Modulator von Leukocyten-vermittelten Entzündungen.....	3
1.3 Gefäßerweiternde Effekte.....	4
Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)	5
ATP-abhängige Kaliumkanäle	5
Calciumkanäle	5
2. Aufgabenstellung	7
3. Material und Methodik.....	8
3.1 Physiologische Nährlösung	8
3.2 Versuchstiere	8
3.3 Isolierung und Präparation der Organe.....	9
3.3.1 Präparation des rechten Vorhofs	9
3.3.2 Präparation des Papillarmuskels	9
3.3.3 Präparation der Arteria pulmonalis.....	10
3.3.4 Präparation des terminalen Ileums	10
3.3.5 Präparation der Aorta	10
3.4 Aufbau der Versuchsaapparaturen	10
3.5 Testsubstanz.....	13
3.5.1 SWS8 HCl.....	13
3.5.2 SWS9 HCl.....	13
3.6 Versuchsablauf	14
3.6.1 Versuchsablauf am Vorhof	14
3.6.2 Versuchsablauf am Papillarmuskel.....	15

3.6.3	Versuchsablauf an der Aorta.....	15
3.6.4	Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis.....	16
3.6.5	Versuchsablauf am terminalen Ileum	16
3.7	Auswertung der Versuchsreihen.....	16
3.7.1	Rechter Vorhof.....	16
3.7.2	Papillarmuskel.....	16
3.7.3	Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum	17
3.8	Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus der Testsubstanzen in Anwesenheit von Vergleichssubstanzen	17
3.8.1	Verwendete Vergleichssubstanzen	17
3.9	Versuchsabläufe in Anwesenheit der Vergleichs-substanzen an der Aorta	19
3.9.1	Versuchsablauf in Anwesenheit von Glibenclamid	19
3.9.2	Versuchsablauf in Anwesenheit von Nitro-L-Arginin.....	20
3.9.3	Versuchsablauf in Anwesenheit von Phenylephrin	20
3.9.4	Versuchsablauf in Anwesenheit von Histamin	20
3.10	Statistik	20
4.	Ergebnisse	22
4.1	Ergebnisse der Testsubstanz SWS8 HCl.....	22
4.1.1	Wirkung von SWS8 HCl auf die Schlagfrequenz des Vorhofs	22
4.1.2	Wirkung von SWS8 HCl auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels	25
4.1.3	Wirkung von SWS8 HCl auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum	28
4.1.4	Wirkung von SWS8 HCl auf Kontraktionskraft der Aorta.....	31
4.1.5	Wirkung von SWS8 HCl auf Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis.....	34
4.2	Ergebnisse der Testsubstanz SWS9 HCl.....	37
4.2.1	Wirkung von SWS9 HCl auf die Schlagfrequenz des Vorhofs	37
4.2.2	Wirkung von SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels	40
4.2.3	Wirkung von SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum	43
4.2.4	Wirkung von SWS9 HCl auf Kontraktionskraft der Aorta.....	46

4.2.5	Wirkung von SWS9 HCl auf Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis.....	49
4.3	Untersuchung des Wirkungsmechanismus von SWS8 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta.....	52
4.3.1	Wirkung von SWS 8 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf die Kontraktionskraft der Aorta	52
4.3.2	Wirkung von SWS 8 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft der Aorta	56
4.4	Untersuchung der Wirkungsmechanismus von SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta.....	59
4.4.1	Wirkung von SWS9 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf die Kontraktionskraft der Aorta	59
4.4.2	Wirkung von SWS9 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft der Aorta	63
4.4.3	Wirkung von SWS9 HCl in Kombination mit Penylephrin auf die Kontraktionskraft der Aorta	66
4.4.4	Wirkung von SWS9 HCl in Kombination mit Histamin auf die Kontraktionskraft der Aorta.....	70
5.	Diskussion	73
6.	Zusammenfassung.....	77
7.	Literaturverzeichnis.....	79
8.	Lebenslauf	82

1. Einleitung

1.1 Vasorelaxierender Effekt von H₂S als neuer gasförmiger endogener ATP abhängiger K- Kanalöffner

H₂S wurde herkömmlich nur als toxisches Gas betrachtet. Dieses Gas wird vom Cystein-Metabolismus erzeugt. In diesem Artikel wird versucht, die physiologische Rolle von H₂S in der Regulation der vaskulären Kontraktilität, die Modulation der H₂S Produktion im vaskulären Gewebe und die zugrundeliegenden Mechanismen zu erklären. Bei in vitro Versuchen bei Ratten relaxiert H₂S die Aortagewebe durch Angriff am ATP abhängigen K-Kanal. In isolierten glatten Muskelzellen ermöglicht H₂S eine direkte Öffnung der ATP abhängigen K-Kanälen und führt somit zur einer Hyperpolarisation der Membran. Die Expression der Enzyme, die für die Bildung von H₂S verantwortlich sind, wurden in vaskulären glatten Muskelzellen identifiziert, jedoch nicht im Endothel. Von Bedeutung ist, dass die H₂S Produktion von den vaskulären Geweben durch NO verbessert wurde. H₂S ist der bedeutendste endogene vasoaktive Faktor und das erste identifizierte Gas, das ATP abhängige K-Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen öffnet. (Zhao et al. 2001).

Schwefelwasserstoff (H₂S) wird als „Gas der verfaulten Eier“ bezeichnet (Winder und Winder 1993, Smith und Gosselin 1979). Wenig anerkannt ist jedoch die Tatsache, dass H₂S auch ein biologisches Gas ist, das endogen in einer durch Cystathionin-β-Synthase (CBS) und/oder Cystathionin-γ-lyase (CSE) katalysierten Reaktion durch Cystein erzeugt wird (Stipanuk und Beck 1982, Hosoki et al. 1997). Ähnlich den anderen endogenen Gasmolekülen, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO) (Wang et al. 1997 a,b), wird vermutet, dass H₂S, unabhängig von seinem toxikologischen Effekt, eine physiologische Rolle in der Regulation kardiovaskulärer Funktionen erfüllt. Im Rahmen dieser Idee zeigte diese Studie, dass H₂S in physiologischen Konzentrationen die hippocampale Langzeitwirkung ermöglicht (Abe und Kimura, 1996). Hosoki et al. (1997) zeigten, dass H₂S in vitro bei Ratten zur einer Relaxation der Aortagewebe führte. Dennoch müssen die zellulären Mechanismen dieses vaskulären Effekts von H₂S, ebenso wie seine physiologische Signifikanz, näher untersucht werden.

NO und CO vermitteln eine Vasorelaxation durch Erhöhung der zellulären cGMP Aktivität und/oder Stimulierung der K_{Ca}-Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen. Wirkt H₂S ebenfalls über diese zellulären Wege? NO und CO können sowohl von glatten Muskelzellen, als auch von Endothelzellen freigesetzt werden. Wird H₂S von den glatten Muskelzellen oder

Endothelzellen oder beiden synthetisiert? Sobald es freigesetzt wird, wirken NO und CO direkt auf die glatten Muskelzellen unabhängig vom Endothel. Wird der vaskuläre Effekt von H₂S vom Endothel vermittelt? Der endogene Stimulus für die Synthese und Freisetzung von NO und CO wurde identifiziert. Was sind die endogenen Regulatoren für die Synthese und Freisetzung von H₂S? Die Beantwortung dieser Fragen würde nicht nur die Rolle von H₂S als einen weiteren endogenen gasförmigen vasoaktiven Faktor erklären, sondern auch neue Mechanismen für die Regulation des vaskulären Tonus ermöglichen.

Man glaubt dass H₂S in physiologisch relevanten Konzentrationen eine Vasorelaxation induziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass H₂S, ähnlich wie NO und CO eine weitere intrinsische, vasoaktive, gasförmige Substanz ist.

NO reguliert die endogenen Ebenen von H₂S in vaskulären Geweben mittels zweier Mechanismen. Zum einen erhöht NO die CSE Aktivität in vaskulären Geweben. CSE besitzt die Fähigkeit L-Cystein zu spalten und somit H₂S, Ammonium und Pyruvate zu bilden. Dieses Enzym wird nur in ein einziges Gewebe ausgeschüttet und ist in der Lunge und im Gehirn nicht nachweisbar (Smith und Gosselin 1979, Abe und Kimura 1996). NO kann die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinasen erhöhen, welches wiederum das CSE stimuliert. Es ist also möglich dass NO direkt auf das CSE Protein wirkt. Die Expression von CSE wird durch NO hochreguliert. Der Mechanismus über welchen NO die CSE Transkription verstärkt, wurde noch nicht geklärt.

Im Unterschied zu NO, das sowohl von Endothelzellen als auch von glatten Muskelzellen produziert werden kann, wird H₂S nur von den glatten Muskelzellen erzeugt, da in den Untersuchungen kein H₂S erzeugendes Enzym im vaskulären Endothel festgestellt werden konnte. In einer früheren Studie wurde allerdings behauptet, dass die Relaxation des Aortagewebes durch H₂S nicht vom Endothel abhängig ist (Hosoki et al. 1997). Die Studie von W Zhao et al. (2001) hat jedoch gezeigt, dass ein kleiner Teil des vasorelaxierenden Effekts durch H₂S vom Endothel verstärkt wurde.

Dies deutet darauf hin, dass H₂S als hyperpolarisierender Faktor wirken könnte, dessen Effekt vom Endothel verstärkt wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, dass aus dem Endothel entstammende vasorelaxierende Faktoren von H₂S freigesetzt worden sein könnten. Dennoch zeigt die Studie von Zhao et al. (2001), dass H₂S an vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen durch bestimmte Mechanismen wirkt. Die regulierende Wirkung von H₂S auf ATP abhängige K-Kanäle kann durch die direkte Interaktion von H₂S und K_{ATP}-

Kanalproteine erklärt werden. Möglicherweise könnte H_2S die Reduktion der Disulfidketten des K_{ATP} -Kanalproteins induzieren (Warenycia et al. 1989).

Zusammengefasst wurde durch die Studien Zhao et al. (2001) gezeigt, dass H_2S ein wichtiger endogener vasorelaxierender Faktor ist. Diese Entdeckung vergrößerte die Familie der vasorelaxierend wirkenden Gase, wie NO und CO (Wang, 1998). Die NO und CO induzierte Vasorelaxation erfolgt über die Aktivierung des cGMP Weges, während die H_2S induzierte Vasorelaxation über die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen und teilweise durch K^+ Leitfähigkeit in Endothelzellen vermittelt wird. Es wurde deutlich gemacht, dass H_2S das einzige bislang bekannte endogene Gas ist, das K_{ATP} -Kanäle öffnet. Es wurden einige endogene Substanzen wie Calcitonin gen-verwandte Peptide identifiziert, die an K_{ATP} -Kanäle wirken (Reslerova und Loutzenhiser 1998, Szilvassy et al. 1999). Die Wirkung dieser endogenen Substanzen wird jedoch durch Membranrezeptor- oder Secondmessenger-gekoppelte Mechanismen vermittelt. Dadurch dass H_2S ein Gas ist, wirkt es direkt auf die K_{ATP} -Kanäle ohne Beeinflussung von Membranrezeptoren. Es scheint, dass NO durch Erhöhung der CSE Expression und die Stimulierung der CSE Aktivität ein physiologischer Modulator der endogenen Produktion von H_2S ist. Es ist vorstellbar, dass die Interaktion zwischen den beiden Gasen, NO und H_2S , als molekularer Schalter für die Regulation des vaskulären Tonus funktionieren könnte.

1.2 Schwefelwassertoff ist ein endogener Modulator von Leukocyten-vermittelten Entzündungen

Gase wie NO und CO spielen eine bedeutende Rolle in verschiedenen gesunden und kranken Geweben. Ein weiteres Gas, H_2S wurde als bedeutender endogener Vasodilator und Neuromodulator erkannt. Wie zuvor bereits erwähnt, wird H_2S in erster Linie von L-Cystein primär durch zwei Enzyme synthetisiert: Cystathion- γ -lyase (CSE) und Cystathion- β -Synthetase (CBS). In manchen Geweben sind beide dieser Enzyme für die Synthese von H_2S notwendig, während in anderen nur eines der beiden notwendig ist. CSE scheint als enzymatische Quelle für H_2S in den Blutgefäßen und im Herz zu überwiegen, während CBS im zentralen Nervensystem (ZNS) überwiegt. Die Relaxation der glatten vaskulären Muskeln durch H_2S erfolgt vermutlich durch Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen. Einige aktuelle Studien legen nahe, dass H_2S eine Rolle bei Entzündungen spielt. H_2S kann Peroxynitrit abfangen und in der Überlagerung mit der Fähigkeit der Neutrophilen mittels unterchloriger Säure Mikroben und andere Zellen abtöten. H_2S kann auch die Apoptose von Neutrophilen induzieren, wodurch es zur Auflösung entzündlicher Reaktionen beiträgt. Vor kurzem wurde

demonstriert, dass H₂S einen analgetischen Effekt in einem viszeralem Schmerzmodell ausübt. Nichtsteroidales Antirheumatikum (NSAIDs) unterdrückt die endogene H₂S Synthese durch Reduktion der CSE Expression. Dieser Effekt könnte auch ein weiterer Grund sein, der zur Schädigung des Magens durch NSAIDs beiträgt (Zanardo et al., 2006).

H₂S Donor unterdrückt die von NSAIDs induzierte Granulocyteninfiltration, die Expression von endothelialen und Leukozyten Adhäsionsmoleküle und die Expression von Tumor Nekrose Faktor α (TNF α). Auch die von Aspirin induzierte Leukozytenanhaftung an dem Gefäßendothel wurde von H₂S unterdrückt. Jüngste Daten legen nahe, dass auch H₂S zu entzündlichen Prozessen beitragen kann. Zum Beispiel wurde in Studien von Nagetier-Modellen der akuten Pankreatitis und der Endotoxinämie ein signifikanter Anstieg der H₂S Produktion und eine Up-Regulation der CSE Expression beobachtet, indessen reduziert die irreversible Inhibition der CSE Aktivität mit DL-Propargylglycine den Schweregrad der Pankreatitis und den endotoxischen Schock.

Die Studie von Zanardo et al. (2006) untersuchte die Auswirkungen der Hemmung der endogenen H₂S-Synthese auf mehrere entzündliche Parameter und der Blockade oder Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle. Im speziellen wurde der Einfluss von H₂S in modularer Leukozytenadhäsion auf vaskuläres Endothelium, die Leukozyteninfiltration und die Bildung von Ödemen untersucht. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass H₂S ein wichtiger endogener Hemmstoff akuter entzündlicher Reaktionen ist (Zanardo et al. 2006).

Außerdem hemmt H₂S die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE). ACE ermöglicht eine gefäßerweiternde Wirkung durch die Verminderung der Angiotensin II Produktion und auch durch den verminderten Abbau des Bradykinin (Laggner et al. 2007). Weitere Wirkungen von H₂S sind die Abnahme der myokardialen Ischämie und des Reperusionsdefekts (Rossoni et al. 2007, Ji et al. 2008).

1.3 Gefäßerweiternde Effekte

Es gibt verschiedene Mechanismen, die den Blutdruck und im Allgemeinen die Kontraktion/Relaxation der glatten Muskelzellen regulieren. Das Spektrum reicht von der Freisetzung von NO mittels eNOS bis auf die K_{ATP}-Kanäle, Calcium Kanäle und adrenerge Rezeptoren. Viele Krankheiten stehen in direktem Zusammenhang mit der Dysfunktion dieser Systeme, wie arterieller Blutdruck einschließlich pulmonaler Hypertonie, Myokardhypertrophie, ventrikuläre Tachykardie, Angina pectoris und Myokardischämie.

Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)

NO ist das kleinste endogen gebildete bioaktive Molekül. Es wird aus der Aminosäure L-Arginin durch drei Isoformen der NO-Synthase synthetisiert (neuronal NO-Synthase, induzierbare NO-Synthase und endotheliale NO-Synthase). Das Gefäßendothel produziert kontinuierlich NO, das wahrscheinlich der wichtigste endogene Vermittler einer Vasodilatation ist. NO bindet an die Häm-Gruppe der löslichen Isoform der Guanylcyclase (GC-S) in der glatten Gefäßmuskulatur. Dieser intrazellulärer „Enzymrezeptor“ bildet aus GTP den Second messenger cGMP. Unter Vermittlung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG) kommt es zur Gefäßrelaxation (Forth et al. 2009).

ATP-abhängige Kaliumkanäle

Die Offenwahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen in der Zellmembran (z.B. der glatten Muskelzellen) bestimmt die Höhe des Ruhemembranpotentials. Mit steigender Offenwahrscheinlichkeit wird das Ruhepotential in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotentials verschoben, die Membran hyperpolarisiert. Als Folge sinkt der Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle. Es gibt verschiedene Typen von Kaliumkanälen. Der Begriff Kaliumkanalöffner (Kaliumkanalaktivatoren) beschreibt eine chemisch heterogene Gruppe von Stoffen, denen die Fähigkeit gemeinsam ist, die Öffnungswahrscheinlichkeit der ATP-empfindlichen Kaliumkanäle (K_{ATP}) zu erhöhen. Diese Wirkung ist besonders ausgeprägt in der glatten Muskulatur arterieller Blutgefäße, wo die Hyperpolarisation und Verringerung des intrazellulären Calciums zur Vasodilatation führt. Diese Kanäle finden sich auch in anderen Zelltypen, so in den Bronchien, im Herzen und in den β -Zellen des Pankreas. Heraus ergeben sich weitere potentielle Wirkungen der Kaliumkanalöffner wie Bronchodilatation, Verkürzung der Aktionspotentials des Myocards (mit pro- oder antiarrhythmischen Wirkungen) und Hemmung der Insulinfreisetzung (Forth et al. 2009).

Calciumkanäle

Verschieden Zellen besitzen verschiedenen Kanäle für Calciumionen. Man klassifiziert die Kanäle nach ihren physiologischen Eigenschaften. T-Kanäle werden bei relativ negativem Membranpotential aktiviert und haben eine geringe Einzelkanalleitfähigkeit. Sie vermitteln transiente Calciumströme, die bedeutsam sind für die Erzeugung von Aktionspotentialen in Neuronen und dem Herzen. L-, N-, und P-Kanäle benötigen ein positiveres Membranpotential für ihre Öffnung. N- und P-Kanäle haben eine mittlere Einzelkanalleitfähigkeit und werden bei Membranpotentialen positiver als -40 mV inaktiviert. Man findet sie vor allem in

Nervenzellen, wo sie für die Neurotransmitterfreisetzung bedeutsam sind. L-Typ-Calciumkanäle haben die größte Einzelleitfähigkeit unter den spannungsabhängigen Calciumkanälen. Sie bleiben auch bei Membranpotentialen positiver als -40 mV noch weitgehend geöffnet und sind der vorherrschende Kanaltyp in der Zellmembran von Muskelzellen. In glatten Gefäßmuskelzellen und dem Herzmuskel sind sie für den Einwärtsstrom des Calciums verantwortlich, das die Kontraktion triggert. Im Sinusknoten und AV-Knoten, deren schnelles Natriumsystem weitgehend inaktiv ist, sind sie auch Träger des Aktionspotentials. Diese L-Kanäle sind die Zielstrukturen der therapeutisch eingesetzten Calciumkanalblocker (Forth et al. 2009).

2. Aufgabenstellung

In dieser Diplomarbeit sollte die Wirkung von zwei neu synthetisierten Substanzen, SWS 8 HCl und SWS 9 HCl, welche möglicherweise als H₂S-Liberatoren fungieren, untersucht werden. Zunächst wurde die Wirkstärke der beiden Verbindungen auf isolierten Präparaten, wie Papillarmuskeln, rechte Vorhöfe, Aorten- und Arteria pulmonalis-Ringe, sowie terminale Ilea von Meerschweinchen getestet. Es sollten Substanzen gefunden werden, die eine Gewebeselektivität aufweisen, d.h. Gefäße dilatieren ohne eine signifikante kardiale Wirkung aufzuweisen.

Ein weiteres Ziel war die Aufklärung der möglichen Wirkmechanismen, welche zur Vasodilatation beitragen könnten. Dazu wurden die Derivate in Anwesenheit von Referenzsubstanzen wie Histamin, Phenylephrin, Glibenclamid und Nitro-L-arginin untersucht. Zuletzt sollten die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit jenen aus der Literatur verglichen und diskutiert werden.

3. Material und Methodik

3.1 Physiologische Nährlösung

Bei der Nährlösung handelte es sich um eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Reiter 1969). Die Nährlösung wurde jeden Tag frisch zubereitet. Die dazu gehörigen Stammlösungen wurden in einen 2 l Kolben eingefüllt. Danach wurde mit destilliertem Wasser mehr als die Hälfte des Volumens aufgefüllt. Die physiologische Nährlösung wurde 20 Minuten mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast. Die dazugehörige CaCl₂ Lösung wurde langsam dazugegeben um eine Ausfällung zu verhindern. Nach der Begasung wurde mit destilliertem Wasser bis zur Markierung des 2l Kolbens aufgefüllt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung für den rechten Vorhof, den Papillarmuskel, die Arteria pulmonalis, die Aorta und das terminale Ileum

Substanz	Stocklösung	ml Stocklösung/ l Tyrode	mmol/l
NaCl	1000.25 g / 5 l	33.60	114.90
KCl	50.33 g / 5 l	35.00	4.73
NaHCO ₃	125.00 g / 5 l	83.70	24.90
MgSO ₄	147.02 g / 5 l	3.20	1.18
KH ₂ PO ₄	62.00 g / 250 ml	1.18	1.18
CaCl ₂	34 g / 250 ml	1.18	3.20
Glucose	Reinsubstanz	1.98	10.00

3.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Meerschweinchen verwendet. Die Tiere der Stämme DH und TRIK hatten ein Körpergewicht von 300-600 g und wurden vom Department für Toxikologie und Labortierzucht (Dobrá Voda, Universität Bratislava, Slowakei) bezogen. Sie wurden in einem klimatisierten Raum mit zwölf Stunden

Tag-Nacht-Zeithrhythmus, bei einer Temperatur von 22-24 °C und einer relativen Feuchtigkeit von 50-60% gehalten. Die Tiere wurden durch einen präzisen und schnellen Genickschlag

getötet. Nach der Tötung des Tieres wurden die Organe entnommen, in die physiologische Nährlösung gegeben und bis zur weiteren Verwendung mit Carbogen begast.

3.3 Isolierung und Präparation der Organe

Nach der Tötung des Tieres wurde der Thorax mit einer Schere geöffnet. Das Herz, die Aorta und der Darm wurden entnommen und in die Nährlösung eingebracht, die mit Carbogen durchperlt wurde. Die weitere Präparation der Organe erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Zusätzlich wurden noch Petrischalen, Kork, Pasteurpipetten, Pinzetten, Federschere und Präpariernadeln benötigt. Die mit dem Kork ausgelegte Petrischale wurde zu drei Viertel mit Nährlösung gefüllt. Das Organ wurde in der Petrischale mit zwei Präpariernadeln befestigt und präpariert.

3.3.1 Präparation des rechten Vorhofs

Das Herz wurde in eine mit physiologischer Nährstofflösung begastete Petrischale mittels zwei Präpariernadeln befestigt. Zuerst wurden Fett- und Bindegewebe sowie Lungenteile vom Herzen entfernt. Danach wurde der rechte Vorhof vom Ventrikel entlang des Sulcus coronarius abgetrennt. An den beiden Enden des rechten Vorhofs wurden mit Hilfe eines Bindfadens zwei Silberhäkchen befestigt. Der rechte Vorhof wurde für Messungen der Schlagfrequenz benutzt.

3.3.2 Präparation des Papillarmuskels

Nach der Abtrennung des rechten Vorhofs wurde der rechte Ventrikel entlang des Septums bis zur Herzspitze vorsichtig geöffnet, aufgeklappt und mit Präpariernadeln fixiert. Anschließend wurden an den Sehnen der Papillarmuskeln Silberdraht-Häkchen befestigt. Die Purkinjefasern wurden abgetrennt, um eine spontane Kontraktion der Muskeln während der Versuche zu verhindern. Danach wurden die Papillarmuskeln herausgeschnitten und bis zu ihrer Verwendung in einer mit Carbogen durchperlter Nährlösung aufbewahrt. Nach Entfernung der Papillarmuskeln aus dem rechten Ventrikel wurden auch jene Papillarmuskeln aus dem linken Ventrikel für die Versuche verwendet. Die Papillarmuskeln hatten einen maximalen Durchmesser von 0,87 mm, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebe zu gewährleisten (Koch-Weser 1963).

3.3.3 Präparation der Arteria pulmonalis

Die herznahe Arteria pulmonalis wurde von anhaftendem Fett und umliegenden Gefäßen befreit. Hierauf wurden 2-3 mm breite Ringe geschnitten und in physiologischer Nährlösung für die nachfolgenden Versuche aufbewahrt.

3.3.4 Präparation des terminalen Ileums

Nach der Entfernung des Herzens wurde das terminale Ileum herausgeschnitten. Der obere Teil wurde mit einem Bindfaden markiert. Für die Versuche wurden 1-2 cm lange Stücke schräg geschnitten. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde das Lumen dieses 1-2 cm langen Stücks mit physiologischer Nährlösung durchgespült und gereinigt. Es war wichtig für die Versuchsergebnisse, dass bei der Präparation die Muskulatur des Darmes unbeschädigt blieb. Des Weiteren wurden an beiden Enden mit Hilfe eines Bindfadens zwei Silberhäkchen angebunden. Dabei war darauf zu achten, dass das Lumen nicht zur Gänze abgebunden wurde um eine spätere Zirkulation der testenden Substanz zu gewährleisten.

3.3.5 Präparation der Aorta

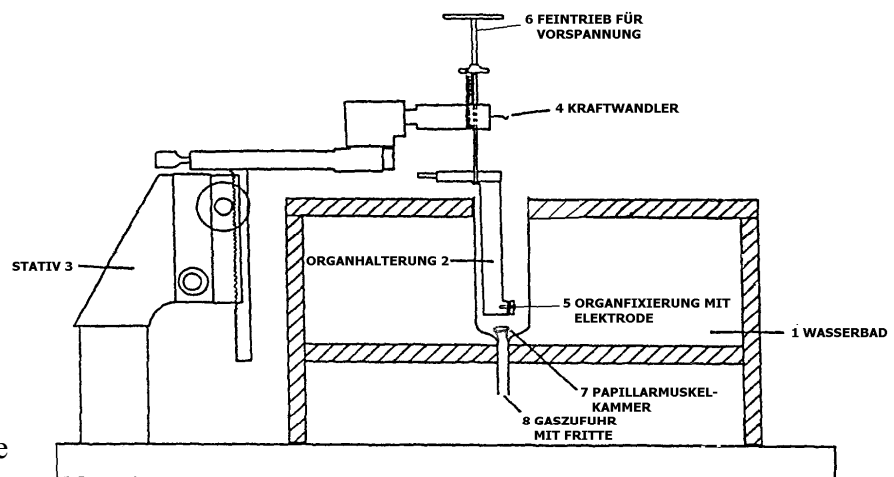
Als letztes wurde die Aorta entnommen, verwendet wurde nur der thorakale Anteil. Die Aorta wurde unter einem Lichtmikroskop vom umgebenden Fettgewebe befreit und in 2-3 mm breite Ringe geschnitten.

3.4 Aufbau der Versuchsaapparaturen

Es wurden zwei verschiedene Apparaturen für die Experimente verwendet. In der Apparatur 1 wurden die Kontraktionsmessungen am Papillarmuskel durchgeführt, während Apparatur 2 für die Messung der Frequenz am rechten Vorhof, sowie für die spasmolytische Wirkung am terminalen Ileum bzw. vasodilatierende Wirkung an den Gefäßen benutzt wurde.

Abbildung 1: Apparatur 1

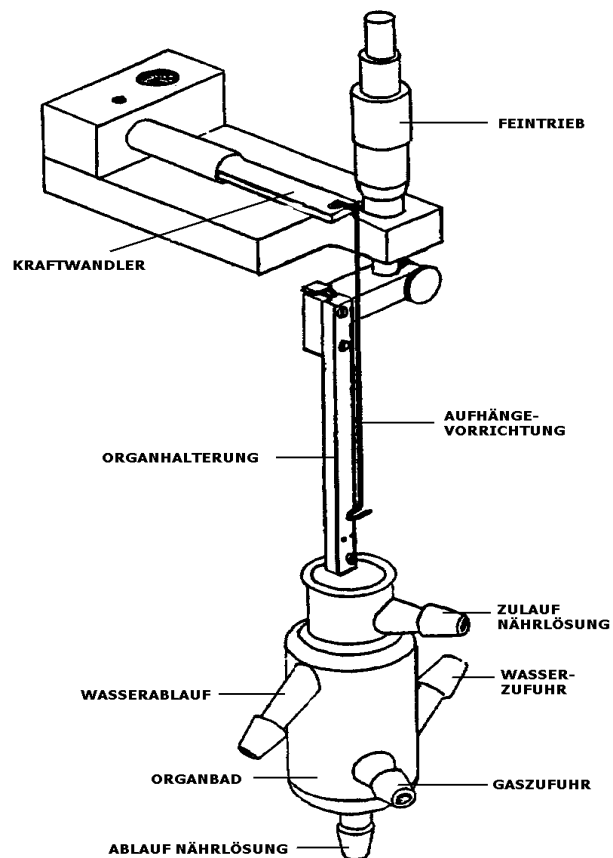
- 1 Wasserbad
- 2 Organbad
- 3 Kraftwandler
- 4 Stativ
- 5 Kathode
- 6 Amplifier
- 7 Gaszufuhr
- 8 Schreiber
- 9 Mikrometerschraube



Mit dieser Apparatur wurden isometrische Kontraktionsmessungen an Papillarmuskeln durchgeführt. Das Organbad hatte ein Volumen von 27 ml. Vorher wurde das Organbad mit destilliertem Wasser ausgespült und dann mit physiologischer Nährlösung auf 25 ml aufgefüllt. Die Versuche wurden bei einer konstanten Temperatur von 35 ± 1 °C durchgeführt. Das Einspannen des vorher präparierten und isolierten Papillarmuskels musste sehr rasch erfolgen, damit es zu keiner Verfälschung der Ergebnisse durch eine Organschädigung kam. Der Papillarmuskel wurde an einem Silberdraht aufgehängt, der mit dem Kraftwandler verbunden war. Das andere Ende des Papillarmuskels wurde mittels eines Plastikplättchens zur Hälfte an einer Platin-Kathode eingequetscht und in das mit physiologischer Nährlösung gefüllte Organbad eingetaucht. Durch diese Elektrode wurde der Papillarmuskel mit Hilfe eines Reizgerätes (Accupulser A310 und Stimulus Isolator A360, World Precision Instruments, Hamden, Florida, USA) stimuliert. Durch die Carbogenzufuhr in die physiologische Lösung wurde für einen pH-Wert von 7,2-7,4 gesorgt. Die einströmende Gasmenge wurde durch einen zwischengeschalteten Hahn fein reguliert. Die Messung isometrischer Kontraktionen wurde mit Hilfe eines Kraftwandlers und eines Verstärkers (TransbridgeTM Channel Transducer Amplifier; World Precision Instruments Sarasota, Florida, USA) durchgeführt, die die Muskelkontraktionen in elektrische Impulse umsetzten. Die Aufzeichnung der Kurven erfolgte mit einem Schreiber (Flated Recorder BD-112 Dual Channel; Firma Kipp & Zonen, Niederlande).

Abbildung 2: Apparatur 2

1. Kraftwandler
2. Mikrometerschraube
3. Organhalterung
4. Organbad
5. Silberdraht (Aufhängvorrichtung)
6. Schreiber
7. Wasserablauf
8. Wasserzufuhr
9. Zulauf Nährlösung
10. Ablauf Nährlösung
11. Gaszufuhr
12. Amplifier



Wie schon oben erwähnt wurde Apparatur 2 für die Messung der Frequenz am rechten Vorhof, sowie für die spasmolytische Wirkung am terminalen Ileum bzw. vasodilatierende Wirkung an den Gefäßen benutzt. Für die Versuche wurden sechs gläserne Organbäder verwendet. Sie bildeten ein System, welches eine möglichst physiologische Umgebung für das Organ herstellte. Umgebungstemperatur von $37 \pm 1^\circ\text{C}$, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt sowie Nährflüssigkeit mit einem pH-Wert von 7,2-7,4 mussten genau auf die Bedürfnisse des Organs abgestimmt werden. Das Organ bestand aus doppelwandigem Glas mit drei verschiedenen Zu- und Ablaufsystemen. Ein System war für die Nährlösungen, ein zweites für die Temperaturregelung und ein drittes für die Gaszufuhr bestimmt. Das Organbad war nach oben hin geöffnet. Dies ermöglichte zum einen die Nährlösungszufuhr und das Einpipettieren der zu testenden Substanz sowie zum anderen, dass die Aufhängvorrichtung in das Bad herabgelassen werden konnte. Nach unten hin gab es eine Ablassvorrichtung für die Nährlösung. Das Organ wurde an seinem oberen und unteren Teil mit Hilfe von Silberhäkchen aufgehängt. Das obere Silberhäkchen wurde an einem Kraftwandler befestigt. Der Kraftwandler war Teil des Aufhängeapparates. An ihm wurden mit Hilfe der Mikrometerschraube Spannungen für das Organ reguliert. Der Kraftwandler setzte die mechanischen Kontraktionen in elektrische Impulse um. Die Messkurven wurden durch einen Schreiber aufgezeichnet.

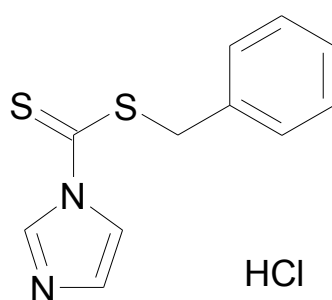
3.5 Testsubstanz

Die Testsubstanzen wurden am Department für Medizinische/pharmazeutische Chemie an der Universität Wien synthetisiert. Die Bereitstellung der Substanzen wurde von Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Erker ermöglicht.

3.5.1 SWS8 HCl

Die chemische Bezeichnung für SWS 8 lautet: 1H-Imidazol-1-yl carbodithiosäurebenzylesterhydrochlorid.

Abbildung 3: Strukturformel SWS 8

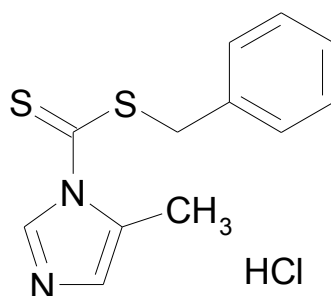


gelbe Kristalle
MG 270,37
 $C_{11}H_{11}ClN_2S_2$

3.5.2 SWS9 HCl

Die chemische Bezeichnung für SWS 9 lautet: 2-Methylimidazol-1-carbodithiosäurebenzylesterhydrochlorid

Abbildung 4: Strukturformel SWS 9



gelbe Kristalle
MG 284
 $C_{12}H_{13}ClN_2S_2$

Während die Testsubstanz SWS 8 wasserlöslich war, wurde SWS 9 in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. DMSO ist ein organisches Lösungsmittel die eine Wirkung auf die isolierten Organe besitzt. Das Lösungsmittel DMSO besitzt eine kontrahierende Wirkung auf die Arteria pulmonalis und auf die Aorta. Auf der anderen Seite besitzt DMSO eine spasmolytische Wirkung auf das terminale Ileum und eine dilatierende Wirkung auf den Papillarmuskel. Beim Vorhof hatte DMSO keine Wirkung. Deshalb wurde beim Ermitteln der Ergebnisse die Wirkung von DMSO berücksichtigt.

3.6 Versuchsablauf

Die Versuche wurden an den isolierten Organen durchgeführt, wobei für jedes isolierte Organ bis zu sechs einzelne Versuche oder mehr nötig waren, um am Ende ein aussagekräftiges Ergebnis zu ermöglichen.

3.6.1 Versuchsablauf am Vorhof

Das Organbad wurde vorher mit 25 ml Tyrode eingefüllt. Es wurde dafür gesorgt, dass die Tyrode die entsprechende Temperatur aufwies und ständig mit Carbogen begast wurde. Der aus dem Meerschweinchen isolierte und präparierte Vorhof wurde sorgsam an der Organhalterung vom Organbad aufgehängt. Im Gegensatz zu den anderen Präparaten musste der Vorhof nicht gereizt werden da er spontan schlug. Nach dem vorsichtigen Aufhängen des Vorhofs wurde der Schreiber eingeschaltet und auf null eingestellt. Als nächstes wurde der Amplifier eingeschaltet und der Vorhof mit Hilfe des Feintriebs auf 10,4 mN vorgespannt, bei einer Stromstärke von 5 mV und einem Speed von 5 ms. Danach wurde der Amplifier wieder auf den Nullpunkt gestellt. Der Vorhof wurde so eingespannt dass die Spitze nach unten zeigte. Man wartete ungefähr 20 Minuten bis sich der in der Tyrode befindliche Vorhof eine konstante Schlagfrequenz aufwies. Währenddessen musste man den Stift des Schreibers mit Hilfe des Amplifiers auf null zurückstellen, da der Vorhof aufgrund der Plastizität nachgibt. Nach den ersten 20 Minuten begann man mit der Kontrolle. Man maß die Schlagfrequenz so lange bis sie konstant war. Die Schlagfrequenz wurde alle fünf Minuten gemessen, wobei 12 Sekunden mit dem Schreiber aufgezeichnet wurde. Bei einer konstanten Schlagfrequenz konnte man mit der Eingabe der Testsubstanz beginnen und mit den entsprechenden Geräten aufzeichnen. Die Testsubstanz wurde in Wasser oder in DMSO gelöst und dann kumulativ in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ in das Organbad hinzugefügt. Die Konzentrationen wurden in Zeitabständen von 45 Minuten verabreicht.

3.6.2 Versuchsablauf am Papillarmuskel

Der präparierte Papillarmuskel wurde wie beim Vorhof in der Halterung des Organbads aufgehängt und mit der Mikrometerschraube des Versuchsapparates auf 3.9 mN vorgespannt, bei einer Verstärkung von 2 bzw. 5 mV und einem Speed von 5 ms. Mit Hilfe des Amplifiers wurde der Stift des Schreibers auf null zurückgestellt. Man musste wie beim Vorhof sehr oft nachjustieren da es durch die Abnahme der Ausgangsspannung zu einer Abnahme der Kontraktion kam. Das Organbad wurde schon vorher wie beim Vorhof mit 25 ml Tyrode befüllt und mit Carbogen begast. Im Gegensatz zum Vorhof musste der Papillarmuskel mit Rechteckimpulsen von 3 ms bei einer Frequenz von 1Hz gereizt werden da er nicht spontan schlug. Die Reizung erfolgte durch eine Elektrode mit Hilfe eines Reizgeräts. Der Papillarmuskel wurde gereizt und sobald er zum schlagen begann erhöhte man die Reizung auf 10% über die Schwellstromstärke. Bei einer zu hohen Reizung würde es zu einer Entleerung der Catecholaminspeicher kommen, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Nach weiteren 40 Minuten wurden ungefähr fünf bis sechs Kontraktionsamplituden alle fünf Minuten am Millimeterpapier aufgezeichnet. Sobald es zur konstanten Kontraktionen kam wurde die Testsubstanz in ihrer jeweiligen Konzentrationen dazugegeben. Wie beim Vorhof musste man für jede dazugegebene Konzentration 45 Minuten warten. Am Ende der 45 Minuten wurden noch vier oder fünf Kontraktionsamplituden mit einem Speed von 20 ms aufgezeichnet. Die Länge der Amplitude wurde gemessen und multipliziert mit einem Eichfaktor von 0,98 mN.

3.6.3 Versuchsablauf an der Aorta

Die isolierte und präparierte Aorta wurde in einem mit begaster Elektrolytlösung gefülltem Organbad an der Organhalterung vorsichtig eingespannt. Mit der Mikrometerschraube des Versuchsapparates wurde eine Vorspannung von 19.6 mN bei 10 mV angelegt. Nach einer Zeit von 20 Minuten wurde das ringförmige Aortenstück auf 5 mV umgestellt und eine Veränderung des Schreibers vom Nullpunkt durch den Feintrieb korrigiert. Die Elektrolytlösung wurde durch die gleiche Menge 90 mmol/l KCl-Lösung ersetzt. Die KCl-Lösung diente zur Vorkontraktion der Aorta und musste jeden Tag frisch vorbereitet werden. Nach Erreichen einer konstanten Kontraktion konnte das Hinzufügen der Testsubstanzen gestartet werden. Wie vorher schon erwähnt wurden die Konzentrationen der Testsubstanzen in Abständen von 45 Minuten einpipettiert. Der Versuchsablauf wurde mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet.

3.6.4 Versuchsablauf an der Arteria pulmonalis

Der Versuch an der Arteria pulmonalis wurde wie bei der Aorta durchgeführt. Der einzige Unterschied war die angelegte Vorspannung von 9.81 mN bei 5 mV Stromstärke.

3.6.5 Versuchsablauf am terminalen Ileum

Der isolierte und präparierte Darm wurde an der Versuchsanordnung eingespannt. Beim Darm wurde eine Vorspannung von 4.9 mN bei 5 mV Stromstärke angelegt. Nach 20 Minuten in der Nährlösung wurde wie bei der Aorta und bei der Arteria pulmonalis mit einer KCl-Lösung vorkontrahiert. In diesem Fall wurden 60 mmol/l KCl-Lösung verwendet. Man wartete so lange mit der Beifügung der Testsubstanz bis eine konstante Kontraktion erreicht wurde. Nach Erreichen der konstanten Kontraktion, die beim Darm mindestens 45 Minuten dauerte, konnte mit dem Hinzufügen der Testsubstanz in Abständen von 45 Minuten gestartet werden. Die Testsubstanz ermöglichte eine Abnahme der Kontraktion, die mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet wurde.

3.7 Auswertung der Versuchsreihen

Für die Auswertung der Versuchsreihen war es wichtig die Eigenwirkung des Lösungsmittel DMSO zu berücksichtigen.

3.7.1 Rechter Vorhof

Beim rechten Vorhof wurde eine Änderung der Schlagfrequenz überprüft. Die Aufzeichnungen erfolgten alle fünf Minuten mit einem Intervall von zwölf Sekunden. Wie schon oben erwähnt wurde um die Schlagfrequenz auszurechnen die Anzahl der Schläge (12 sec) mit fünf multipliziert. Durch den Kontrollwert, der mit 0 % definiert wurde, konnte eine Abnahme bzw. Zunahme der Schlagfrequenz für die jeweiligen Konzentrationen prozentuell und in mN ermittelt werden. Die Testsubstanz wurde kumulativ hinzugefügt. Die Konzentrationen betrugen 1, 3, 10, 30 und 100 μ M.

3.7.2 Papillarmuskel

Die Auswertung des Papillarmuskels erfolgte durch die Messung der Länge der Amplitude mit Hilfe eines Lineals. Eine Länge von 1 cm entsprach eine Verstärkung von 5 mV und 0.98 mN. Somit wurde die Länge der Amplitude mit 0.98 mN multipliziert. Wie beim Vorhof wurde ein Kontrollwert von 0 % definiert. Daraus wurde die Abnahme oder Zunahmen der Kontraktion, durch die Testsubstanzen, prozentuell und in mN berechnet.

3.7.3 Aorta, Arteria pulmonalis und terminales Ileum

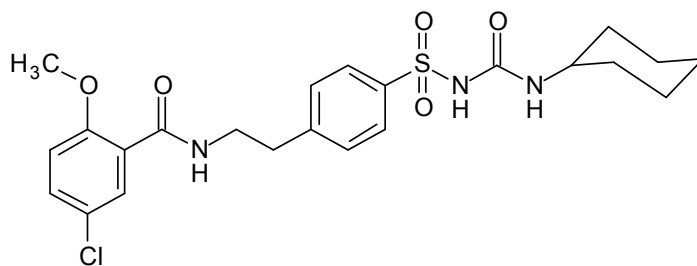
Nachdem sich eine konstante Vorkontraktion einstellte, wurde die Substanz kumulativ den entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt. Die vasodilatierende und spasmolytische Wirkung wurde jeweils nach 45 Minuten gemessen. Zu diesem Zeitpunkt war ein "steady state" erreicht. Die Abmessung erfolgte in cm und wurde mit dem Eichfaktor von 0.98 mN multipliziert.

3.8 Untersuchung des möglichen Wirkmechanismus der Testsubstanzen in Anwesenheit von Vergleichssubstanzen

3.8.1 Verwendete Vergleichssubstanzen

- Glibenclamid

Abbildung 5: Glibenclamid (MG = 494,0 g/mol)

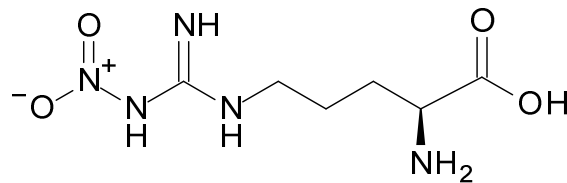


Hier handelt es sich um ein oral verabreichbare, blutzuckersenkendes Arzneimittel. Glibenclamid ist ein Sulfonylharnstoffderivat der beim Diabetes Typ 2 eingesetzt wird. Die Sulfonylharnstoffderivate binden an den Sulfonylharnstoffrezeptor der Insulin-bildenden B-Zellen der Pankreasinseln. Sie regen diese an, zusätzliches Insulin abzugeben. Damit sind neben der erwünschten Blutzuckersenkung auch unerwünschte Effekte verbunden, wie hypoglykämische Reaktionen und eine Hyperinsulinämie. Es ist gezeigt worden, dass in Gegenwart von ATP die Kaliumpermeabilität der Zellmembran abnimmt und als Folge davon die Zellmembran depolarisiert wird, wodurch die spannungsabhängigen Calciumkanäle sich öffnen. So wird die Exocytose des granulär gespeicherten Insulin in gleicherweise ausgelöst wie durch Glucose. Durch den Calciumeinstrom in die Inselzelle wird die Sekretion von Insulin ausgelöst. Sulfonylharnstoffe können Kaliumpermeabilität der Zellmembran

vermindert und dadurch die Aktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle einleiten. Sie blockieren den ATP-abhängigen Kaliumkanal. Die wichtigste unerwünschte Wirkung sind schwere und lang anhaltende hypoglykämische Zustände. Gelegentlich kommt es zu einem Wachstum der Schilddrüse, weiterhin kann ein cholestatischer Ikterus auftreten, auch eine Leukopenie oder Thrombozytenpenie. Sehr selten kommt es zu Agranulozytosen. (Forth et al. 2009).

• Nitro-L-Arginin

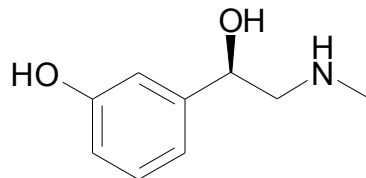
Abbildung 6: Nitro-L-Arginin (MG= 219, 20 g /mol)



Nitro-L-Arginin ist ein Nitro-Derivat der Aminosäure Arginin. Es ist ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase und damit eine vaso- und koronarerkonstriktor. (Bansinath et al. 1993). Das Gefäßendothel produziert kontinuierlich Stickstoffmonoxid (NO), welches wahrscheinlich der wichtigste endogene Vermittler einer Vasodilatation ist. NO bindet an die Häm-Gruppe der löslichen Isoform der Guanylylcyclase (GC-S) in der glatten Gefäßmuskulatur. Dieser intrazelluläre „ Enzymrezeptor“ bildet aus GTP den second messenger cGMP. Unter Vermittlung der cGMP abhängigen Proteinkinase G (PKG) kommt es zur Gefäßrelaxation. (Cooper und Mowbray 2004, Forth et al. 2009).

• Phenylephrin

Abbildung 7: Phenylefrin (MG = 167, 21 g/ mol)

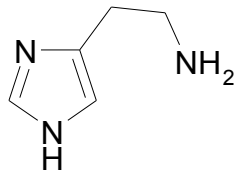


Phenylephrin gehört zu den direkt wirkenden Sympathomimetika mit teilweise indirekter Wirkung. Es wirkt als Agonist am α_1 -adrenergen Rezeptor. Phenylephrin ist bis auf eine fehlende 3- Hydroxylgruppe strukturgleich mit Adrenalin und wird hauptsächlich als lokaler Vasokonstriktor verwendet, z. B. als Wirkstoff von Nasenspray zum Abschwellen der

Schleimhäute im Naseninneren. In Augentropfen wirkt es als Mydriatikum, führt also zu einer Weitstellung der Pupillen. Phenylephrin wird u. a. im Rahmen der Geburtshilfe- auch als Vasopressor verwendet. Die Wirkung ist am ehesten mit der von Noradrenalin vergleichbar. Noradrenalin und Adrenalin lösen ihre Wirkungen über α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_2 - Adrenozeptoren aus. α_1 - Adrenozeptoren, wenn aktiviert, aktivieren ihrerseits ein G-Protein der G_q -Familie. (Forth et 2009).

• Histamin

Abbildung 8: Histamin (MG = 111,15 g/ mol)



Histamin wird in einer Einschnitt-Reaktion unter Katalyse der cytoplasmatischen L – Histidin – Decarboxylase aus Histidin gebildet und vesikulär gespeichert. Es gibt drei Gruppen von Histamin – Rezeptoren, H_1 , H_2 und H_3 . Sie sind an G – Proteine gekoppelt. Aktivierte H_1 -Rezeptoren stimulieren die phosphatidylinosit - spezifische Phospholipase C. Über H_1 – Rezeptoren erhöht Histamin z.B. die Gefäßpermeabilität und den Tonus der Bronchialmuskulatur. Aktivierte H_2 – Rezeptoren stimulieren die Adenylcyclase und steigern so z.B. die Herzfrequenz und die Magensäuresekretion. Der Transduktionsmechanismus der H_3 – Rezeptoren ist nicht bekannt. Über präsynaptische H_3 – Autorezeptoren hemmt Histamin seine eigene Freisetzung (Forth et al. 2009).

3.9 Versuchsabläufe in Anwesenheit der Vergleichssubstanzen an der Aorta

Da die gefäßerweiternde Wirkung an der Aorta am stärksten war, wurde dieses Präparat herangezogen. Man konnte mit Hilfe der Vergleichssubstanzen auf einem möglichen Wirkungsmechanismus der Testsubstanzen schließen.

3.9.1 Versuchsablauf in Anwesenheit von Glibenclamid

Die Durchführung des Versuchsablaufes wurde bereits im Kapitel 3.6.3 näher erläutert. Nach dem Erreichen einer konstanten Kontraktion mit der 90 mmol/l KCl- Lösung, wurde die Wirkung in Anwesenheit von Glibenclamid, in Konzentrationen von 30 μ mol/l und 100 μ mol/l untersucht. Die Konzentration der SWS8 HCl betrug 30 μ mol/l und der SWS9 HCl

betrug 4 $\mu\text{mol/l}$. Nach einer entsprechenden Kontrollperiode wurde Glibenclamid der Badlösung zugegeben und 45 Minuten gewartet. Anschließend wurden die Testsubstanzen dazugegeben und weitere 45 Minuten gewartet. Die Auswertung erfolgte wie im Kapitel 3.7 beschrieben.

3.9.2 Versuchsablauf in Anwesenheit von Nitro-L-Arginin

Die Durchführung des Versuchsablaufes wurde bereits im Kapitel 3.9.1 näher erläutert. Anstelle von Glibenclamid wurde hier mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin gearbeitet.

3.9.3 Versuchsablauf in Anwesenheit von Phenylephrin

Die Präparation der Aortaringe wurden wie bereits im Kapitel 3.6.3 beschrieben, verwendet. Phenylephrin wurde in den Konzentration 10, 3, 1, 0,3, und 0,1 $\mu\text{mol/l}$, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe hergestellt wurden, untersucht. Zunächst wurde die höchste Konzentration von Phenylephrin in das Organbad injiziert und die Kontraktion für etwa 40 Sekunden mit dem Schreiber aufgezeichnet. Danach wurde die Aorta zwei Mal mit der Lösung für die Dauer von 10 Minuten ausgewaschen. Dieser Prozess wurde für alle Konzentrationen wiederholt. Danach wurde SWS9 HCl in einer Konzentration von 4 $\mu\text{mol/l}$ hinzugefügt und 45 Minuten abgewartet. Im Anschluss daran wurde wiederum Phenylephrin in der höchsten Konzentrationstufe von 10 $\mu\text{mol/l}$ injiziert und die Kontraktion für etwa 40 Sekunden aufgezeichnet. Anschließend wurde mit Nährlösung, die 4 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz enthielt zwei Mal für die Dauer von 10 Minuten ausgewaschen. Dieser Prozess wurde für alle Konzentrationen von Phenylephrin wiederholt.

3.9.4 Versuchsablauf in Anwesenheit von Histamin

Die Versuchsabläufe in Anwesenheit von Histamin wurden wie im Kapitel 3.9.3 näher erläutert. Die Histaminkonzentrationen betrugen 10, 3, 1, 0,3 $\mu\text{mol/l}$, die wiederum mit einer Verdünnungsreihe ermittelt wurden.

3.10 Statistik

Von den erhaltenen Messdaten wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet, sowohl in mN als auch in Prozent. Die Auswertung erfolgte mittels der Software „Sigma Plot 9.0“. Etwaige EC_{50} Werte wurden graphisch dargestellt. Zur

statistischen Signifikanz wurde der Student-t-Test für gepaarte Beobachtungen herangezogen. Werte < 0.05 bzw 0.01 gelten als signifikant, Werte < 0.001 als hoch signifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Testsubstanz SWS8 HCl

4.1.1 Wirkung von SWS8 HCl auf die Schlagfrequenz des Vorhofs

Beim Vorhof kam es zu keiner signifikanten Abnahme der Schlagfrequenz durch die Testsubstanz SWS8 HCl. Bei den ersten drei Konzentrationen kam es zu keiner wesentlichen Änderung der Schlagfrequenz. Wobei eine negative chronotrope Wirkung erstmals bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wurde. Die EC_{50} konnte aufgrund der geringen Wirkung nicht ermittelt werden.

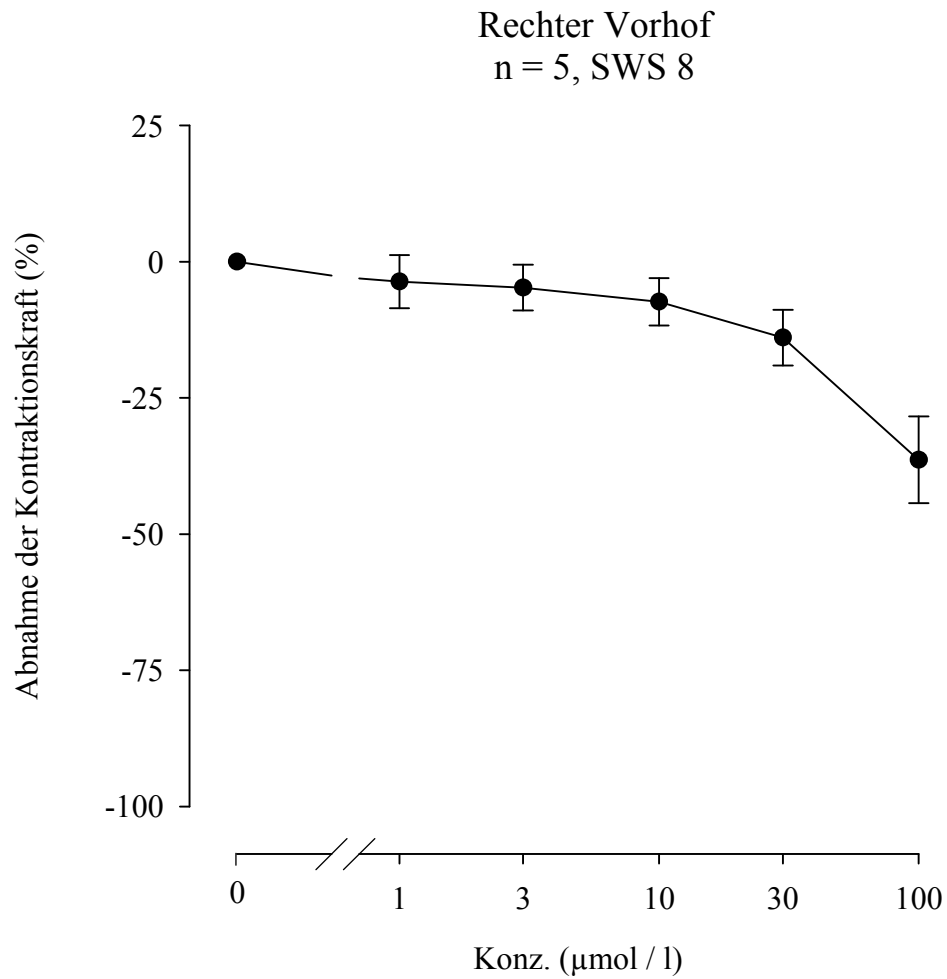
Tabelle 2: Wirkung von SWS8 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$187 \pm 11,79$	0	5	-
1	$180 \pm 14,83$	$-3,66 \pm 4,88$	5	n.s.
3	$178 \pm 14,02$	$-4,75 \pm 4,18$	5	n.s.
10	$173 \pm 13,47$	$-7,35 \pm 4,36$	5	n.s.
30	$161 \pm 14,09$	$-13,94 \pm 5,11$	5	0.05
100	$118 \pm 16,32$	$-36,97 \pm 7,97$	5	0.01

Legende zu Tabelle 2:

Die Tabelle umfasst Informationen über die Mittelwerte der Schlagfrequenz und deren Standardabweichungen in mN und in Prozent sowie über die Anzahl der Versuche. Die Wirkung der Testsubstanz war für die ersten drei Konzentrationen nicht signifikant. Bei Konzentrationen von 30 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer geringen Abnahme der Schlagfrequenz.

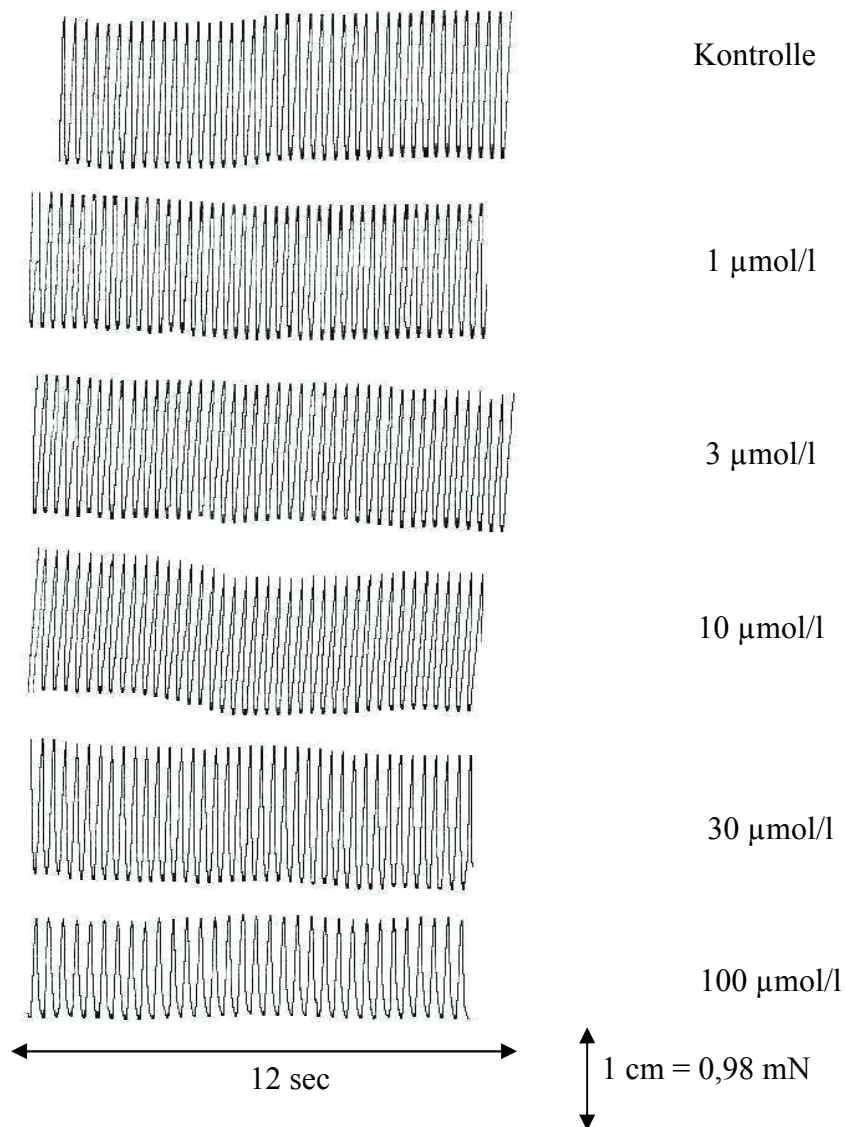
Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS8 HCl am rechten Vorhof



Legende zu Abbildung 9:

Hier wird graphisch in Form von einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz auf den rechten Vorhof dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffs angezeigt wird.

Abbildung 10: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz am rechten Vorhof



Legende zu Abbildung 10:

Die Originalabbildung zeigt eine leichte Abnahme der Schlagfrequenz bei einer Konzentration von 30 µmol/l.

4.1.2 Wirkung von SWS8 HCl auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Beim Papillarmuskel wurden fünf Versuche durchgeführt und ausgewertet. Wobei auch hier die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung in mN und in Prozent ermittelt wurden.

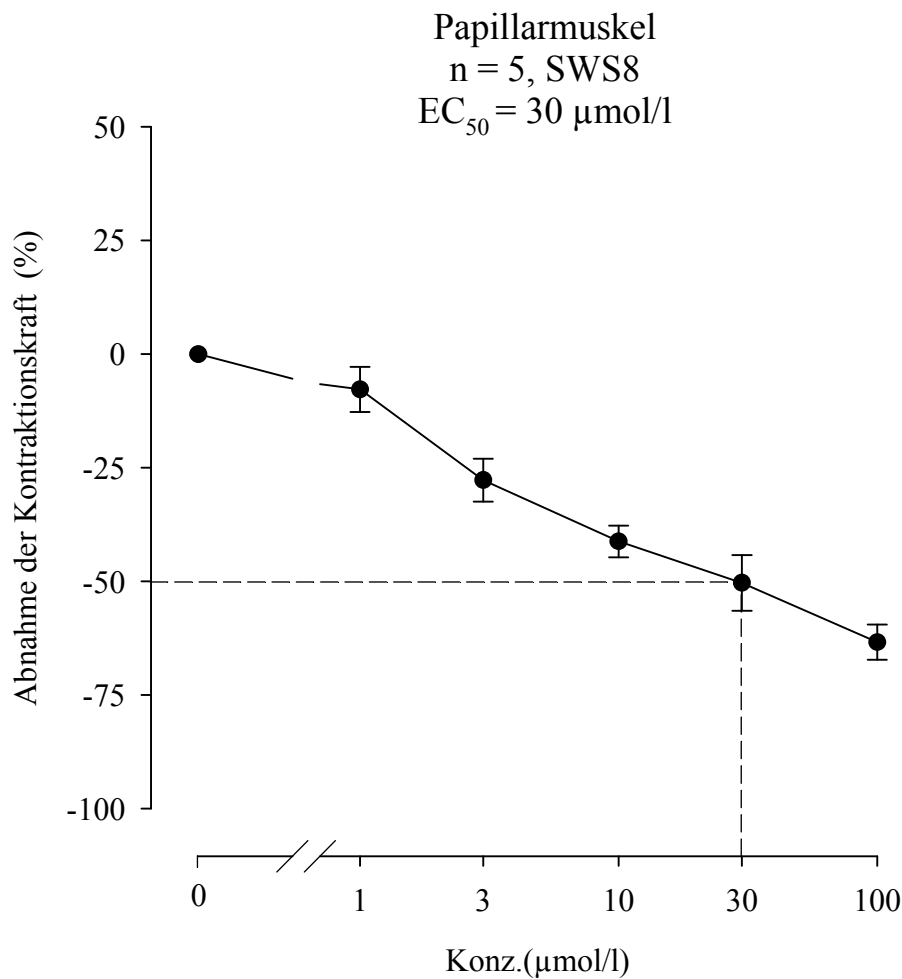
Tabelle 3: Wirkung von SWS8 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$2,44 \pm 0,63$	0	5	-
1	$2,19 \pm 0,49$	$-7,77 \pm 4,96$	5	n.s.
3	$1,78 \pm 0,47$	$-27,74 \pm 4,71$	5	n.s.
10	$1,48 \pm 0,42$	$-41,21 \pm 3,52$	5	0,05
30	$1,41 \pm 0,5$	$-50,3 \pm 6,14$	5	0,01
100	$0,93 \pm 0,33$	$-63,38 \pm 3,86$	5	0,001

Legende zu Tabelle 3:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion des Papillarmuskels und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

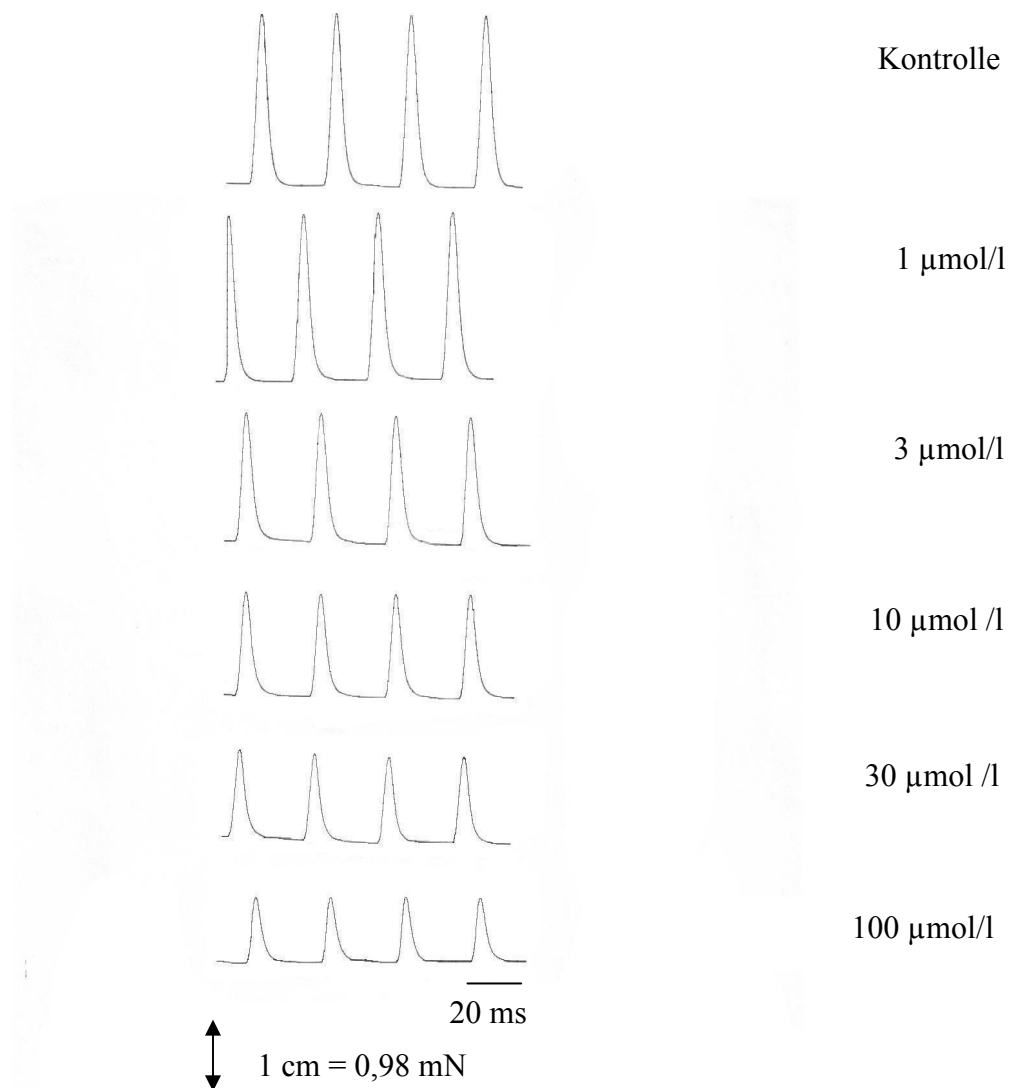
Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS8 HCl am Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 11:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz am Papillarmuskel dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes in $\mu\text{mol/l}$ gezeigt wird. Die aus den Punkten herausragenden Balken umfassen die Standardfehler und die Punkte selbst die Mittelwerte aus den fünf Versuchen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es durch die Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft des Papillarmuskels kommt. Eine EC_{50} von $30 \mu\text{mol/l}$ wird durch die beiden strichlierten Linien gezeigt.

Abbildung 12: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz am Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 12:

Die Originalabbildung zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft am Papillarmuskel.

4.1.3 Wirkung von SWS8 HCl auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum

Beim Darm wurden sechs Versuche durchgeführt und ausgewertet. Wobei auch hier die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung in mN und in Prozent ermittelt wurden.

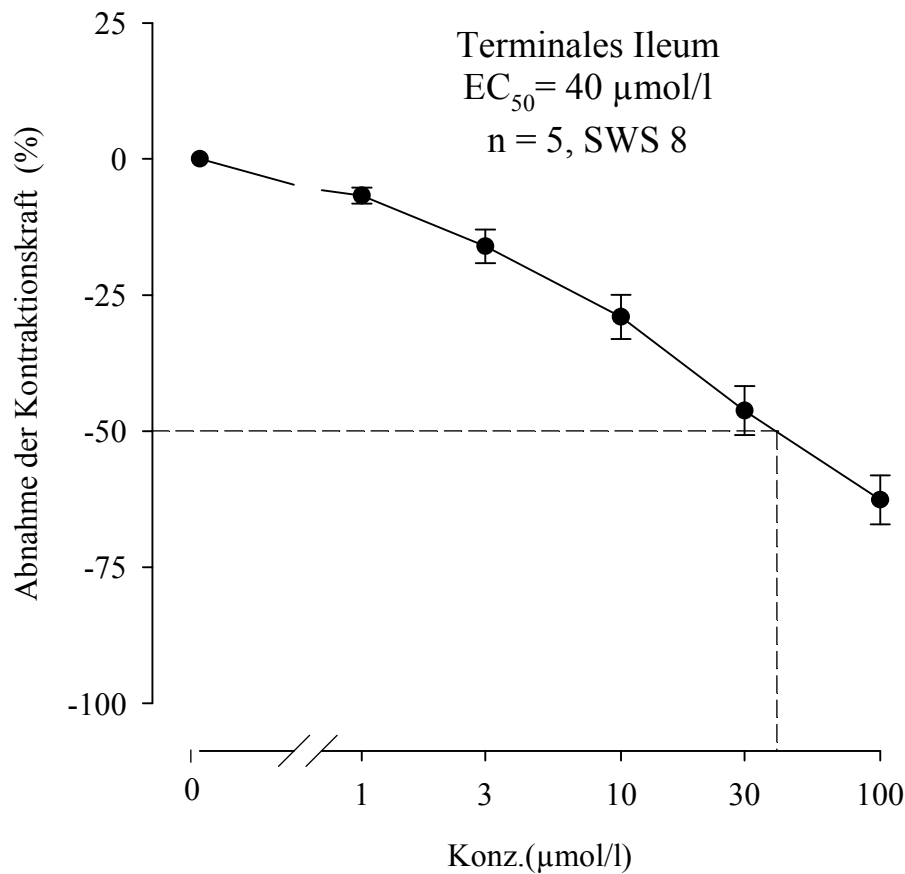
Tabelle 4: Wirkung von SWS8 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$9,41 \pm 1,47$	0	5	0,01
1	$8,86 \pm 1,35$	$-5,62 \pm 1,66$	5	0,01
3	$8,14 \pm 1,28$	$-13,58 \pm 3,53$	5	0,01
10	$7,14 \pm 1,23$	$-24,98 \pm 5,21$	5	0,001
30	$5,73 \pm 1,14$	$-40,65 \pm 6,69$	5	0,001
100	$4,01 \pm 0,89$	$-58,83 \pm 5,30$	5	0,001

Legende zu Tabelle 4:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Darmpräparate und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Aufgezeigt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

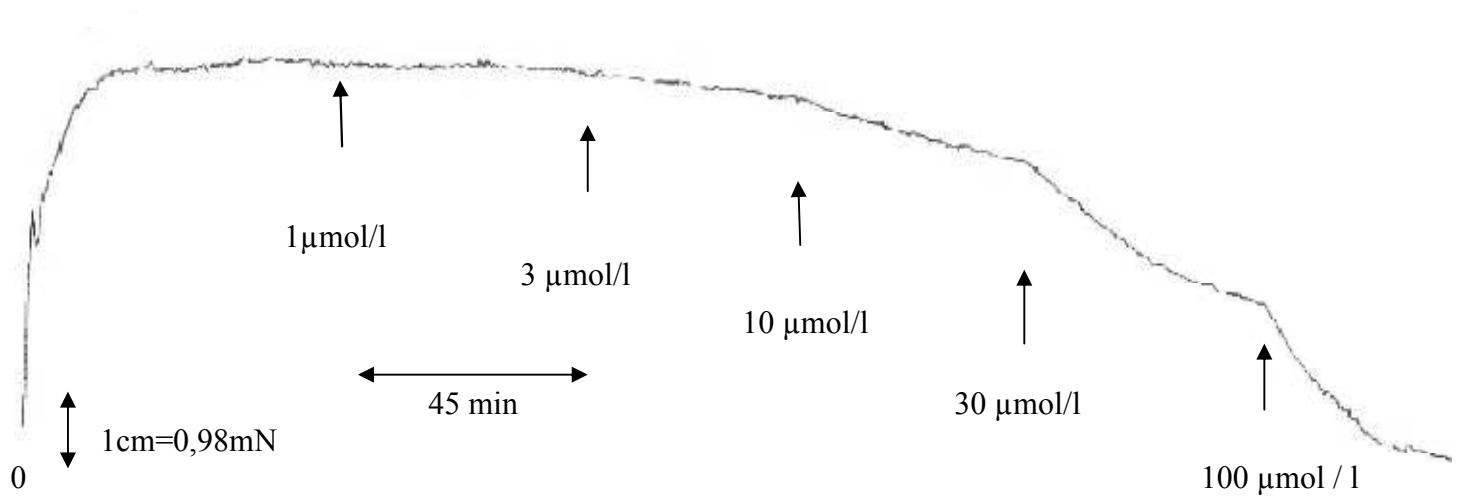
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS8 HCl am terminalen Ileum



Legende zu Abbildung 13:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz am terminalen Ileum dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes in $\mu\text{mol/l}$ gezeigt wird. Die aus den Punkten herausragenden Balken umfassen die Standardfehler und die Punkte selbst die Mittelwerte aus den fünf Versuchen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es durch die Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft des Darms kommt. Eine EC_{50} von $40 \mu\text{mol/l}$ wird durch die beiden strichlierten Linien gezeigt.

Abbildung 14: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz am terminalen Ileum



Legende zu Abbildung 14:

Die Originalabbildung zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft des Darms.

4.1.4 Wirkung von SWS8 HCl auf Kontraktionskraft der Aorta

Bei der Aorta wurden sieben Versuche durchgeführt und ausgewertet. Wobei auch hier die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung in mN und in Prozent ermittelt wurden.

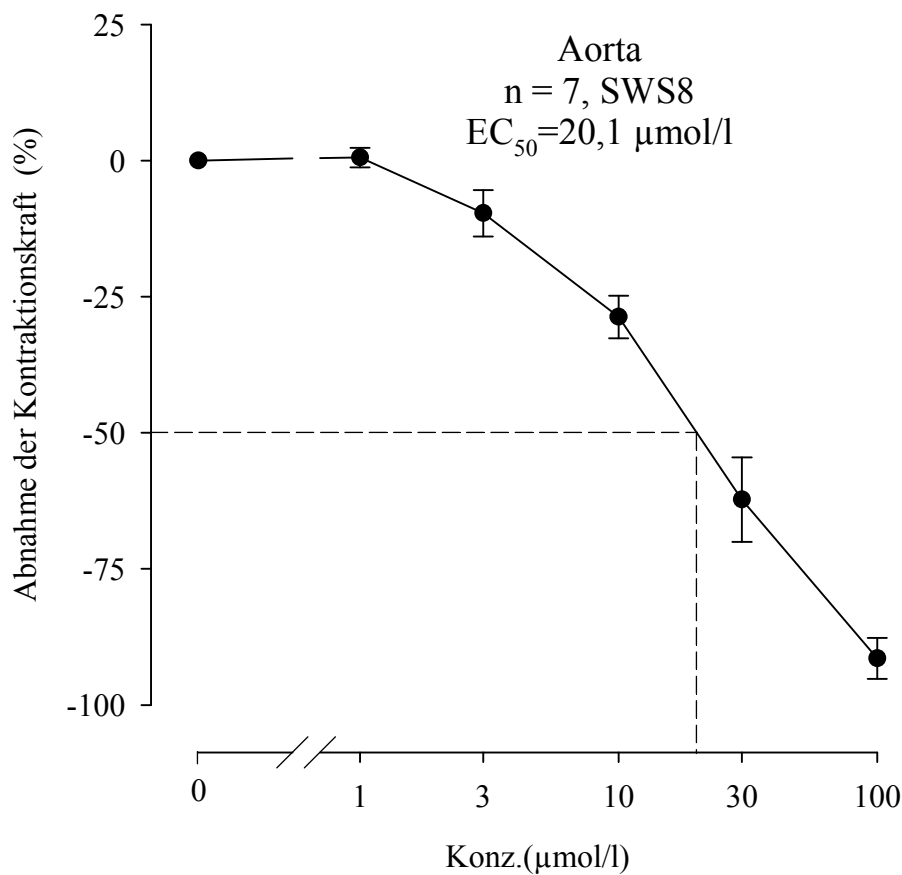
Tabelle 5: Wirkung von SWS8 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$9,95 \pm 1,04$	0	7	-
1	$10,03 \pm 1,09$	$0,56 \pm 1,82$	7	n.s.
3	$8,96 \pm 1,02$	$-9,68 \pm 4,26$	7	n.s.
10	$7,02 \pm 0,73$	$-28,72 \pm 3,90$	7	0,001
30	$3,66 \pm 0,77$	$-62,27 \pm 7,77$	7	0,001
100	$0,81 \pm 0,37$	$-91,44 \pm 3,88$	7	0,001

Legende zu Tabelle 5:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aortapräparate und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

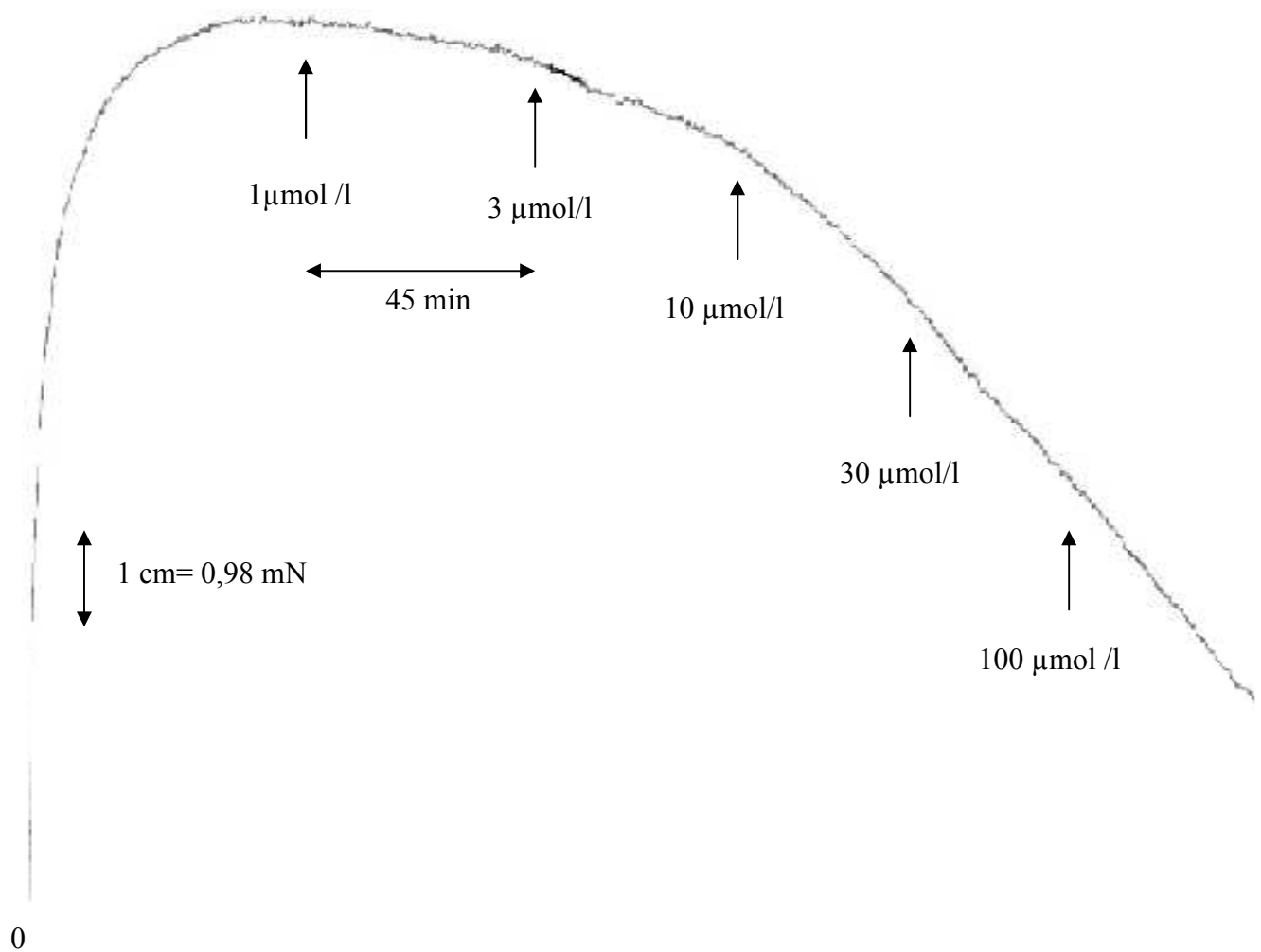
Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS8 HCl an der Aorta



Legende zu Abbildung 15:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz an der Aorta dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes in µmol/l gezeigt wird. Die aus den Punkten herausragenden Balken umfassen die Standardfehler und die Punkte selbst die Mittelwerte aus den sieben Versuchen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es durch die Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta kommt. Eine EC₅₀ von 20,1 µmol/l wird durch die beiden strichlierten Linien gezeigt.

Abbildung 16: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz an der Aorta



Legende zu Abbildung 16:

Die Originalabbildung zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft an der Aorta.

4.1.5 Wirkung von SWS8 HCl auf Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Bei der Arteria pulmonalis wurden sechs Versuche durchgeführt und ausgewertet. Wobei auch hier die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung in mN und in Prozent ermittelt wurden.

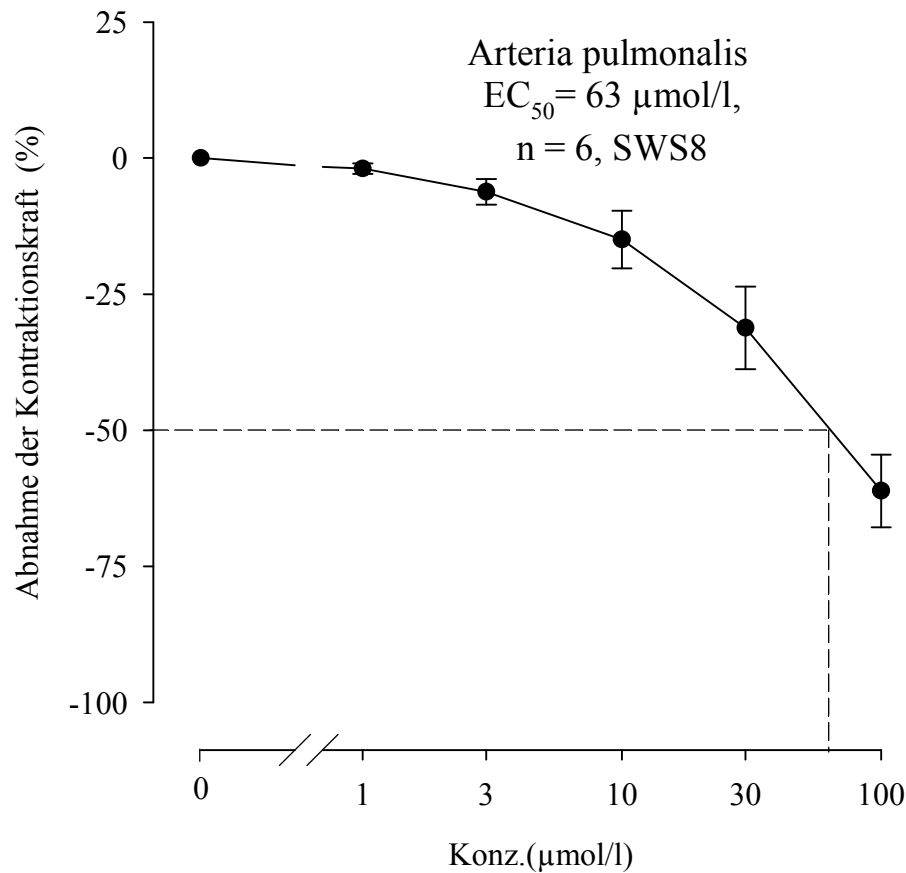
Tabelle 6: Wirkung von SWS8 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$10,53 \pm 1,40$	0	6	-
1	$10,37 \pm 1,43$	$-1,93 \pm 0,99$	6	n.s.
3	$9,94 \pm 1,44$	$-6,21 \pm 2,36$	6	0,05
10	$9,04 \pm 1,50$	$-14,95 \pm 5,29$	6	0,01
30	$7,38 \pm 1,43$	$-31,2 \pm 7,61$	6	0,001
100	$4,35 \pm 1,11$	$-61,15 \pm 6,68$	6	0,001

Legende zu Tabelle 6:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Arteria pulmonalis-Präparate und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

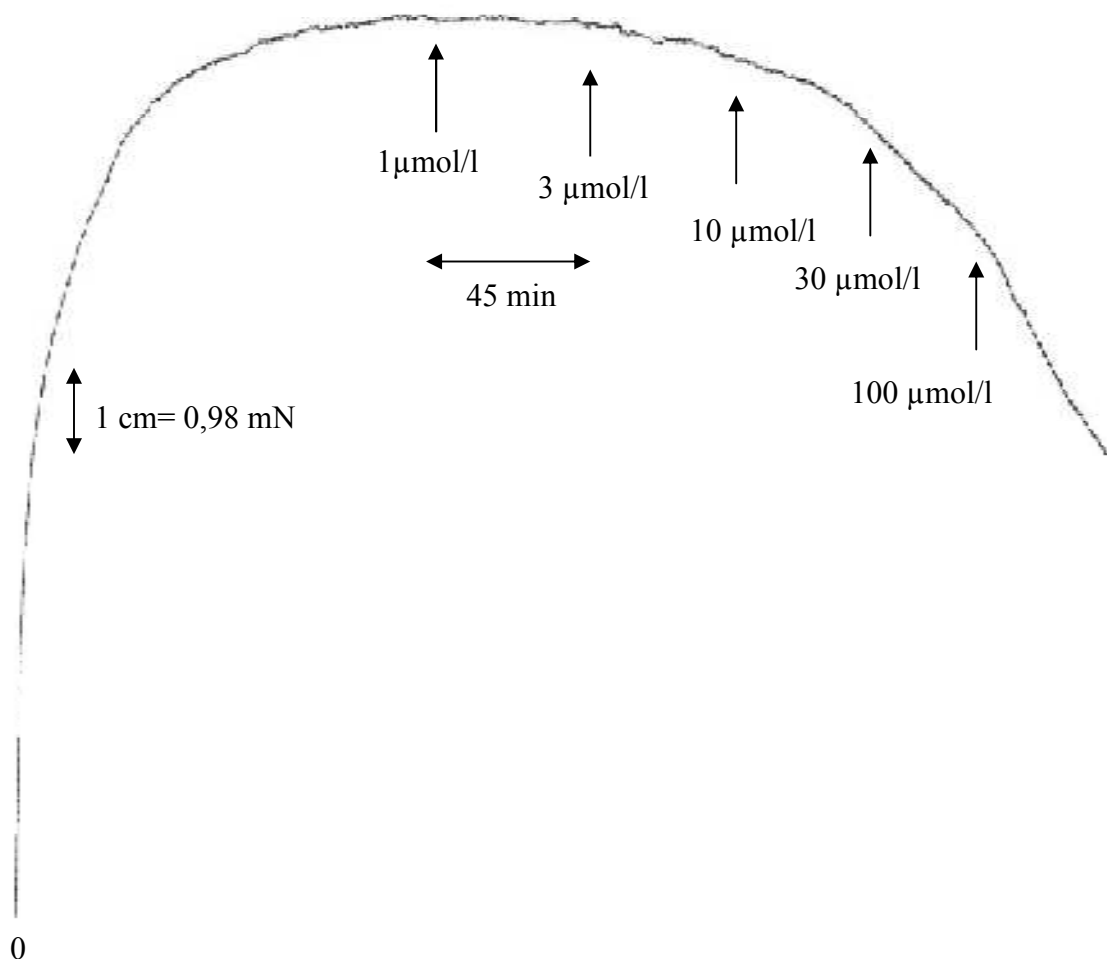
Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS8 HCl an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 17:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz an der Arteria pulmonalis dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes in $\mu\text{mol/l}$ gezeigt wird. Die aus den Punkten herausragenden Balken umfassen die Standardfehler und die Punkte selbst die Mittelwerte aus den sechs Versuchen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es durch die Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta kommt. Eine EC_{50} von $63 \mu\text{mol/l}$ wird durch die beiden strichlierten Linien gezeigt.

Abbildung 18: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 18:

Die Originalabbildung zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft an der Arteria pulmonalis.

4.2 Ergebnisse der Testsubstanz SWS9 HCl

4.2.1 Wirkung von SWS9 HCl auf die Schlagfrequenz des Vorhofs

Beim Vorhof kam es zu keiner signifikanten Abnahme der Schlagfrequenz durch die Testsubstanz SWS9 HCl. Bei den ersten drei Konzentrationen kam es zu keiner wesentlichen Änderung der Schlagfrequenz. Wobei eine negative chronotrope Wirkung erstmals bei einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ gesehen wurde. Die EC_{50} konnte bei 15,6 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden.

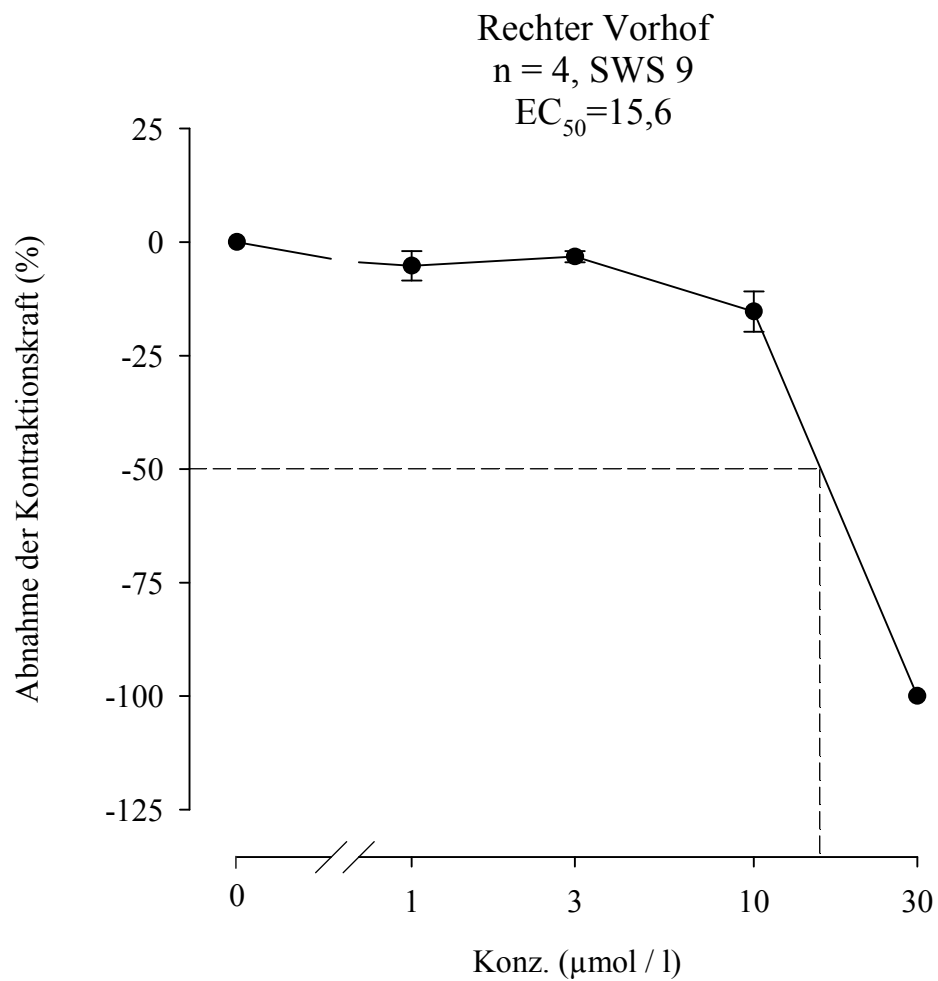
Tabelle 7: Wirkung SWS9 HCl

SWS9 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	198,75 \pm 9,44	0	4	-
1	187,50 \pm 2,5	-5,24 \pm 3,25	4	n.s.
3	186,25 \pm 3,15	-3,25 \pm 1,64	4	n.s.
10	167,50 \pm 3,23	-15,30 \pm 4,42	4	0,05
30	0 \pm 0	-100 \pm 0	4	0.001
100	0 \pm 0	-100 \pm 0	4	0.001

Legende zu Tabelle 7:

Die Tabelle umfasst Informationen über die Mittelwerte der Schlagfrequenz und den Standardabweichungen in mN und in Prozent sowie über die Anzahl der Versuche. Die Wirkung der Testsubstanz war nach der dritten Konzentration signifikant. Bei Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Abnahme der Schlagfrequenz.

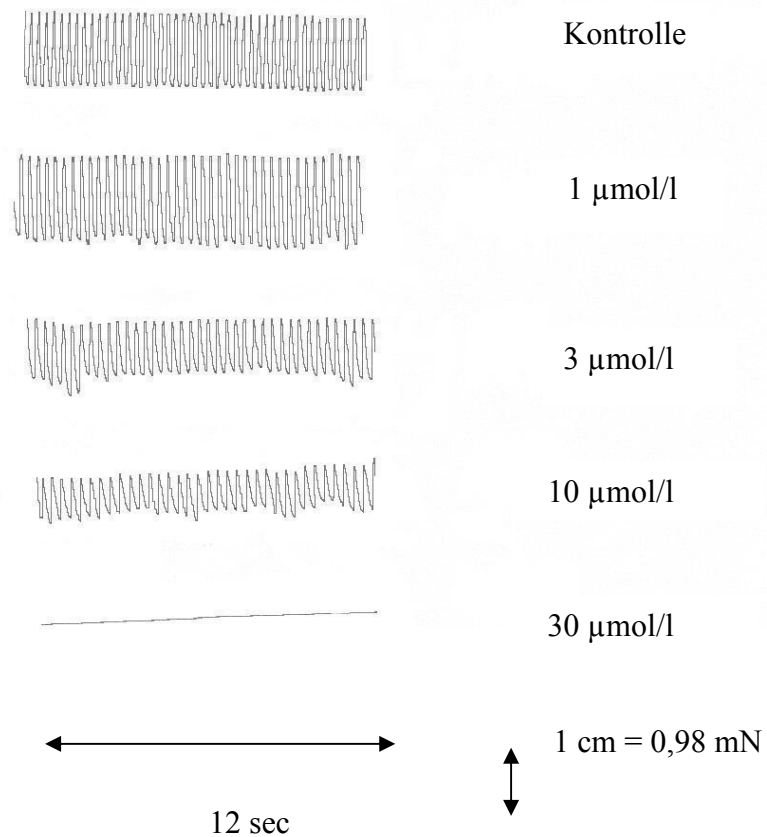
Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS9 HCl am rechten Vorhof



Legende zu Abbildung 19:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testschubstanz auf den rechten Vorhof dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes gezeigt wird.

Abbildung 20: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz am rechten Vorhof



Legende zu Abbildung 20:

Die Originalabbildung zeigt eine Abnahme der Kontraktionskraft am rechten Vorhof. Bei einer Konzentration von 30 µmol/l kommt es zu einer vollständigen Abnahme der Schlagfrequenz.

4.2.2 Wirkung von SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft des Papillarmuskels

Beim Papillarmuskel wurden neun Versuche durchgeführt und ausgewertet. Wobei auch hier die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung in mN und in Prozent ermittelt wurden.

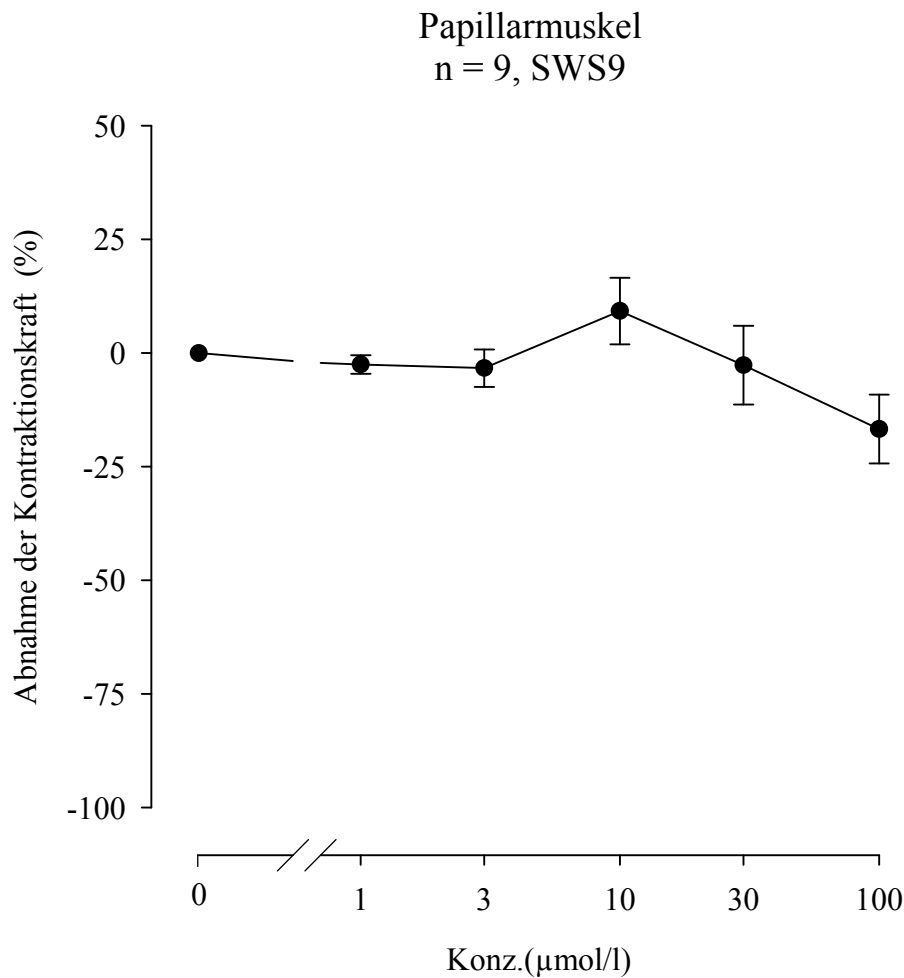
Tabelle 8: Wirkung von SWS9 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$1,24 \pm 0,19$	0	9	-
1	$1,21 \pm 0,19$	$-2,54 \pm 2,04$	9	n.s.
3	$1,21 \pm 0,2$	$-3,34 \pm 4,11$	9	n.s.
10	$1,34 \pm 0,22$	$9,24 \pm 7,34$	9	n.s.
30	$1,28 \pm 0,3$	$-2,67 \pm 8,66$	9	n.s.
100	$1,04 \pm 0,19$	$-16,73 \pm 7,57$	9	0,05

Legende zu Tabelle 8:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion des Papillarmuskels und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

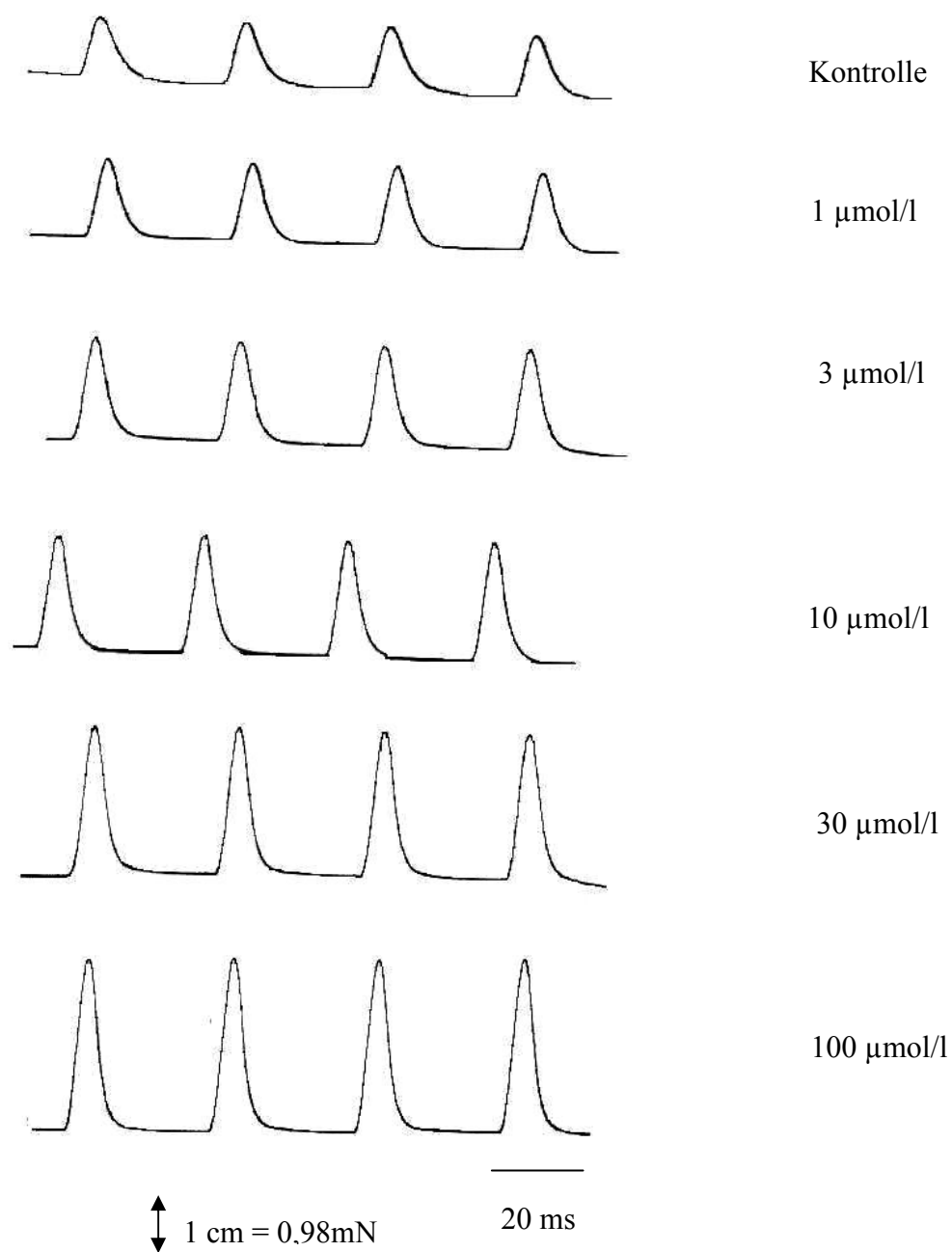
Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS9 HCl am Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 21:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz am Papillarmuskel dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes in $\mu\text{mol/l}$ gezeigt wird. Die aus den Punkten herausragenden Balken umfassen die Standardfehler und die Punkte selbst die Mittelwerte aus den neun Versuchen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es durch die Testsubstanz zu keiner Abnahme der Kontraktionskraft des Papillarmuskels kommt.

Abbildung 22: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz am Papillarmuskel



Legende zu Abbildung 22:

Die Originalabbildung zeigt keine Abnahme der Kontraktionskraft am Papillarmuskel.

4.2.3 Wirkung von SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft des terminalen Ileum

Beim Darm wurden fünf Versuche durchgeführt und ausgewertet. Wobei auch hier die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung in mN und in Prozent ermittelt wurden.

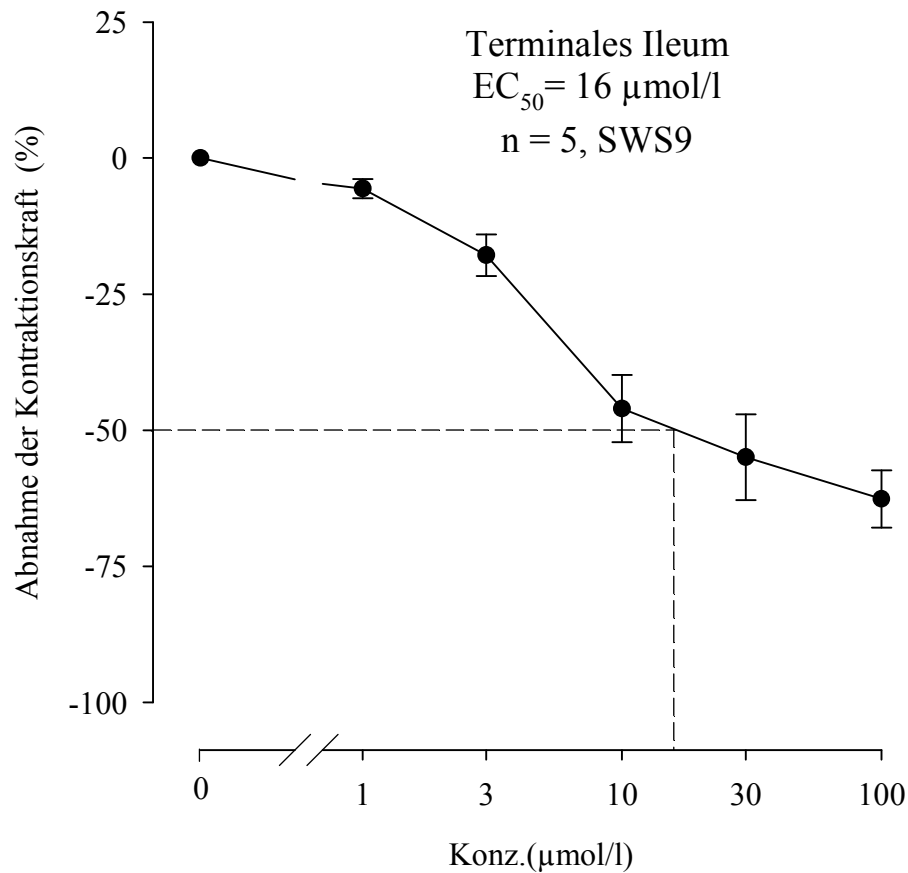
Tabelle 9: Wirkung von SWS9 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$13,02 \pm 1,87$	0	5	n.s.
1	$11,72 \pm 1,60$	$-5,62 \pm 1,77$	5	0,001
3	$10,95 \pm 1,96$	$-17,85 \pm 3,86$	5	0,001
10	$8,92 \pm 2,03$	$-46,04 \pm 6,17$	5	0,001
30	$6,44 \pm 1,80$	$-54,95 \pm 7,88$	5	0,001
100	$5,24 \pm 1,30$	$-62,63 \pm 5,27$	5	0,001

Legende zu Tabelle 9:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Darmpräparate und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Aufgezeigt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

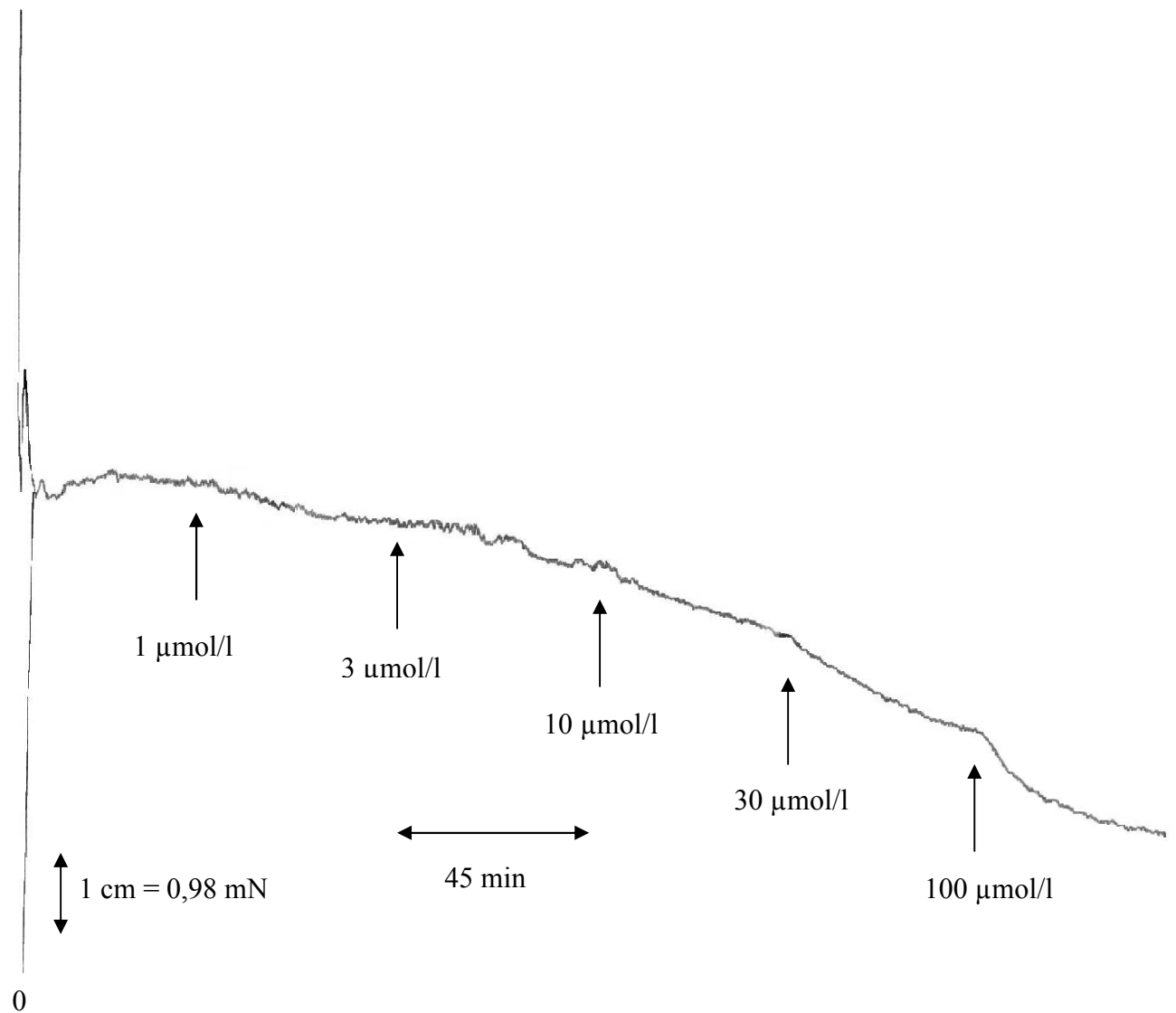
Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS8 HCl am terminalen Ileum



Legende zu Abbildung 23:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz am terminalen Ileum dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes in $\mu\text{mol/l}$ gezeigt wird. Die aus den Punkten herausragenden Balken umfassen die Standardfehler und die Punkte selbst, die Mittelwerte aus den sechs Versuchen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es durch die Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft des Darms kommt. Eine EC_{50} von 16 $\mu\text{mol/l}$ wird durch die beiden strichlierten Linien gezeigt.

Abbildung 24: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz am terminalen Ileum



Legende zu Abbildung24:

Die Originalabbildung zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft des Darms.

4.2.4 Wirkung von SWS9 HCl auf Kontraktionskraft der Aorta

Bei der Aorta wurden fünf Versuche durchgeführt und ausgewertet. Wobei auch hier die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung in mN und in Prozent ermittelt wurden.

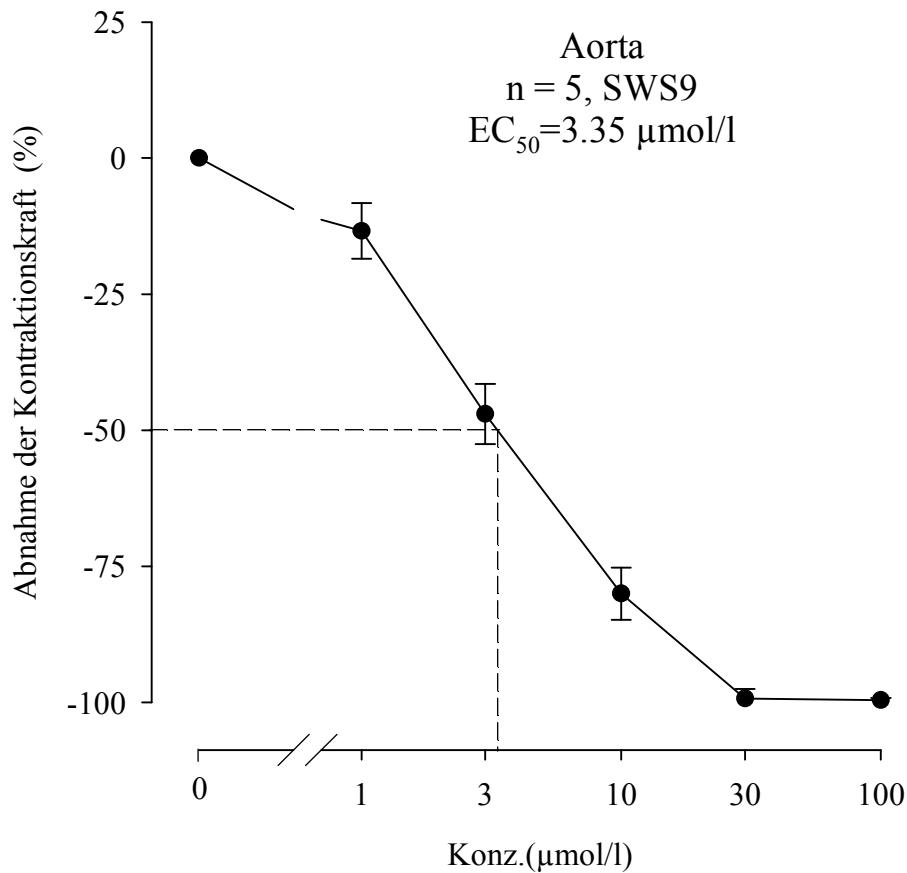
Tabelle 10: Wirkung von SWS9 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$8,99 \pm 1,07$	0	5	-
1	$7,68 \pm 0,76$	$-13,41 \pm 5,11$	5	n.s.
3	$4,68 \pm 0,52$	$-47,01 \pm 5,51$	5	0,001
10	$1,81 \pm 0,44$	$-80,03 \pm 4,80$	5	0,001
30	$0,21 \pm 0,21$	$-99,28 \pm 1,72$	5	0,001
100	$0,05 \pm 0,05$	$-99,59 \pm 0,41$	5	0,001

Legende zu Tabelle 10:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aortapräparate und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

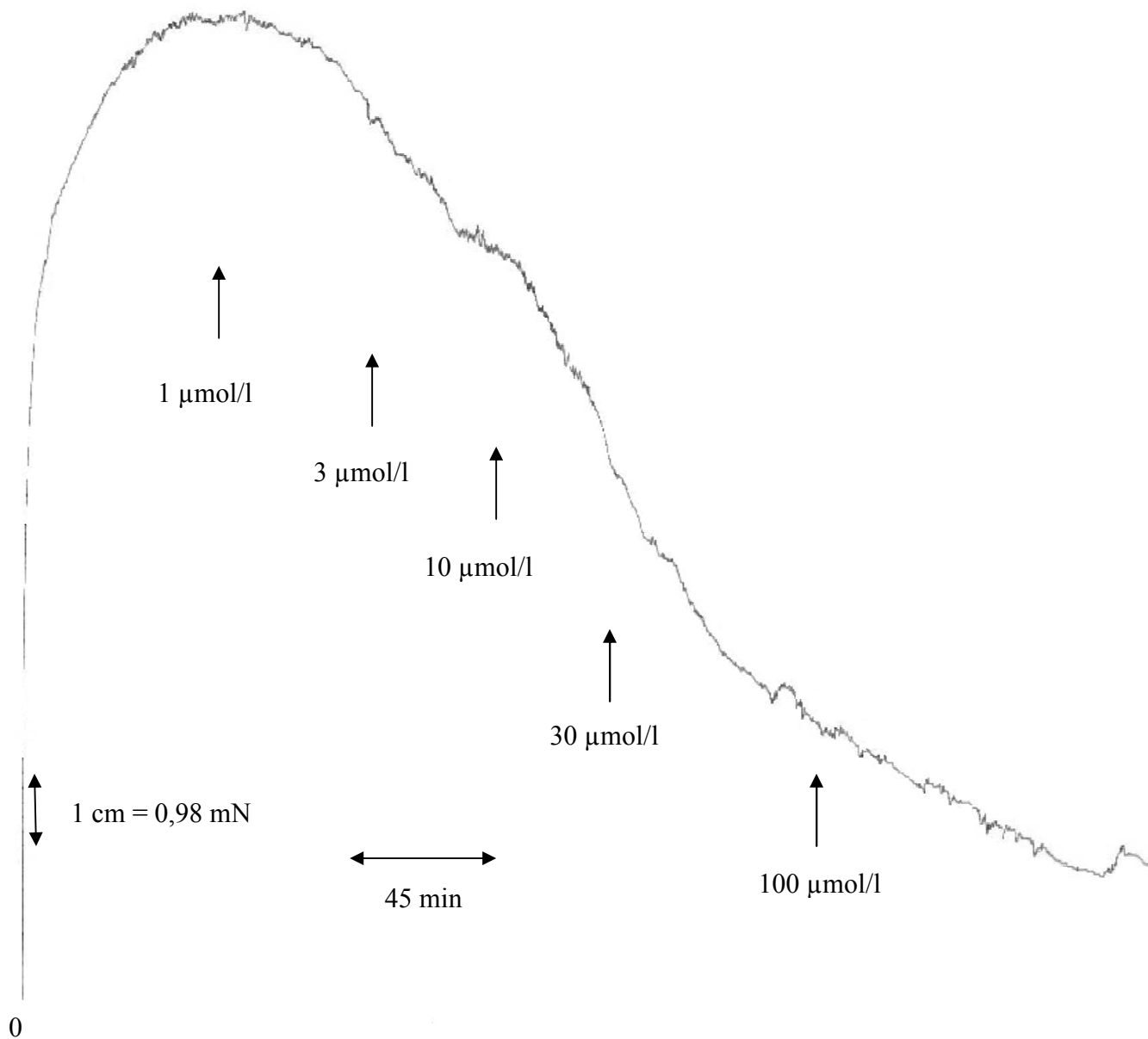
Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS9 HCl an der Aorta



Legende zu Abbildung 25:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz an der Aorta dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes in µmol/l gezeigt wird. Die aus den Punkten herausragenden Balken umfassen die Standardfehler und die Punkte selbst die Mittelwerte aus den sieben Versuchen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es durch die Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta kommt. Eine EC₅₀ von 3,35 µmol/l wird durch die beiden strichlierten Linien gezeigt.

Abbildung 26: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz an der Aorta.



Legende zu Abbildung 26:

Die Originalabbildung zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft an der Aorta.

4.2.5 Wirkung von SWS9 HCl auf Kontraktionskraft der Arteria pulmonalis

Bei der Arteria pulmonalis wurden fünf Versuche durchgeführt und ausgewertet. Wobei auch hier die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichung in mN und in Prozent ermittelt wurden.

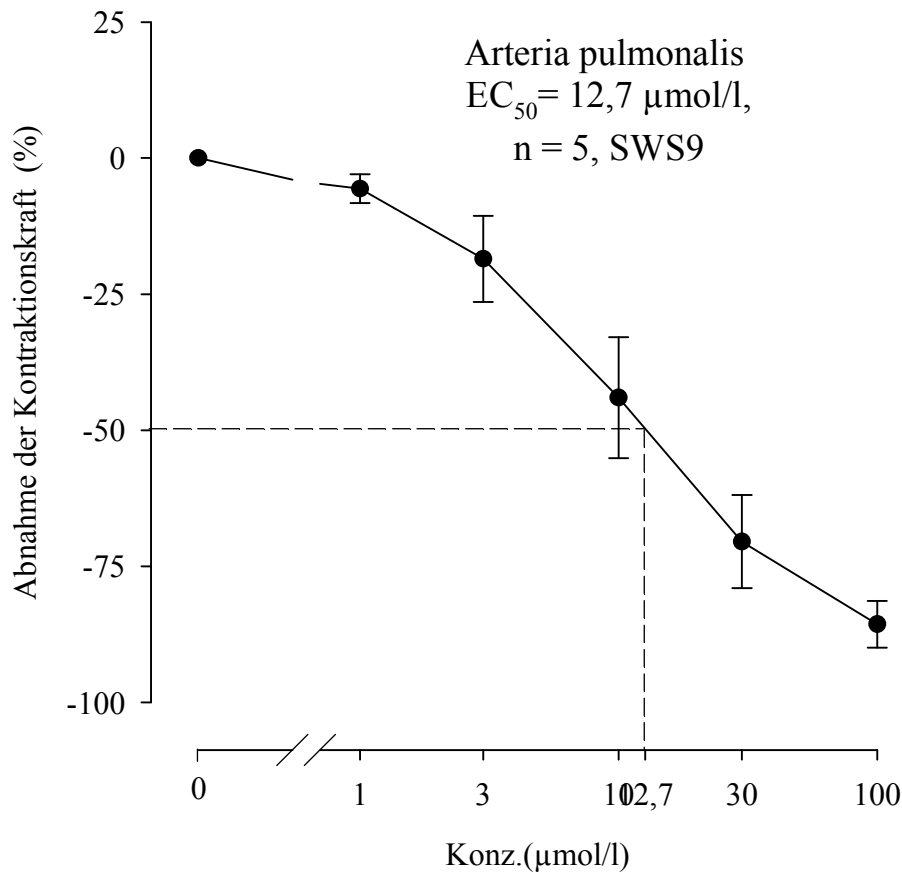
Tabelle 11: Wirkung von SWS9 HCl

SWS8 HCl ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (x/min)	$f_c \pm \text{SEM}$ (%)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$12,64 \pm 0,75$	0	5	-
1	$12,01 \pm 0,96$	$-5,64 \pm 2,65$	5	n.s.
3	$10,51 \pm 1,42$	$-18,52 \pm 7,91$	5	0.05
10	$7,38 \pm 1,62$	$-44,02 \pm 11,09$	5	0,01
30	$3,90 \pm 1,19$	$-70,47 \pm 8,55$	5	0,001
100	$1,85 \pm 0,60$	$-85,64 \pm 4,30$	5	0,001

Legende zu Tabelle 11:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Arteria pulmonalis-Präparate und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

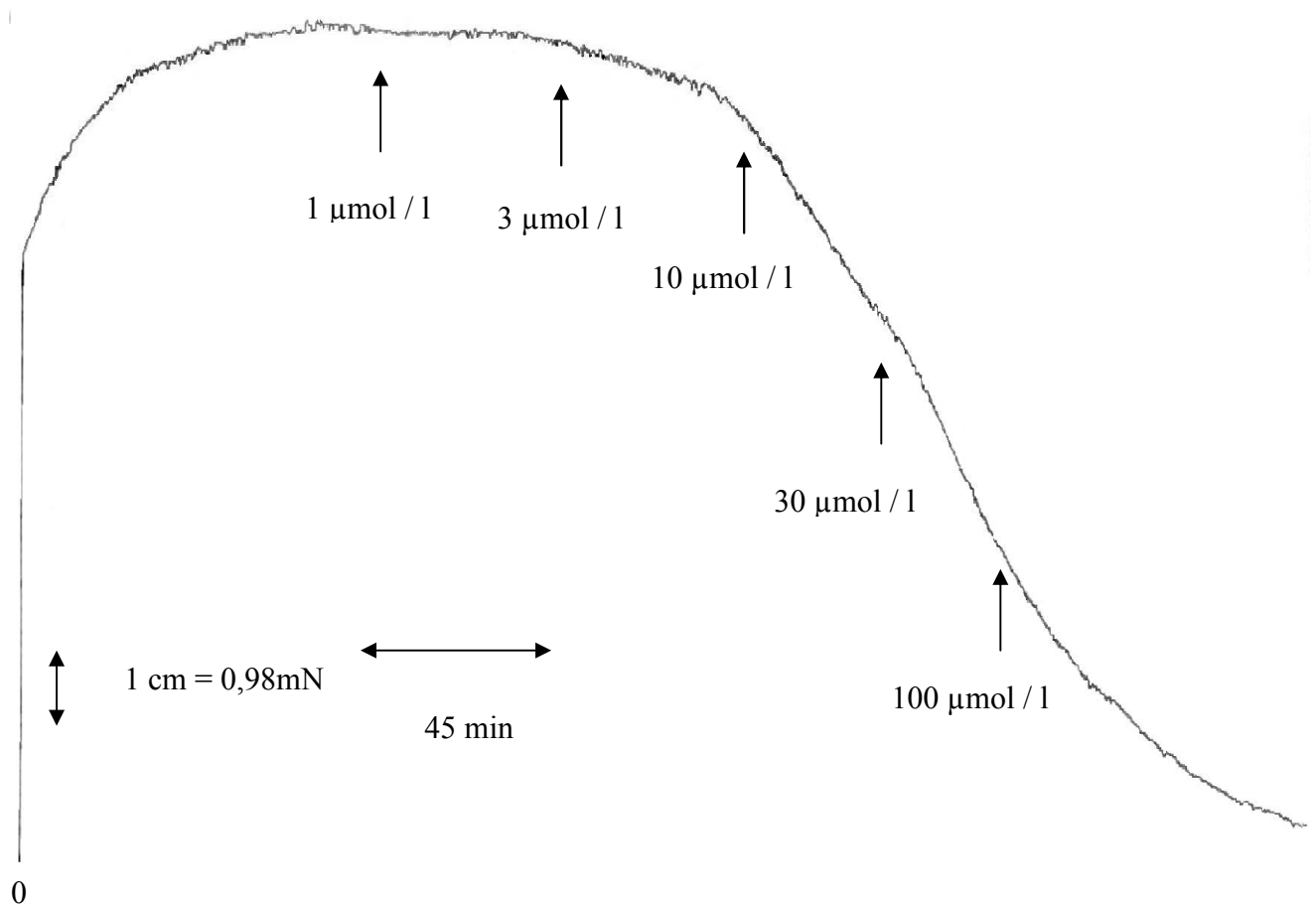
Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungskurve von SWS9 HCl an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 27:

Hier wird graphisch in Form einer Konzentrationswirkungskurve die Wirkung der Testsubstanz an der Arteria pulmonalis dargestellt. Die Konzentrationswirkungskurve umfasst eine Ordinate, welche die Abnahme der Kontraktionskraft in Prozent angibt und eine Abszisse, an der die Konzentration des Wirkstoffes in $\mu\text{mol/l}$ gezeigt wird. Die aus den Punkten herausragenden Balken umfassen die Standardfehler und die Punkte selbst die Mittelwerte aus den sechs Versuchen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass es durch die Testsubstanz zu einer Abnahme der Kontraktionskraft der Aorta kommt. Eine EC_{50} von 12,7 μmol wird durch die beiden strichlierten Linien gezeigt

Abbildung 28: Originalaufzeichnung der untersuchten Testsubstanz an der Arteria pulmonalis



Legende zu Abbildung 28:

Die Originalabbildung zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Kontraktionskraft an der Arteria pulmonalis.

4.3 Untersuchung des Wirkungsmechanismus von SWS8 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta

Wie im Kapitel 3.8 schon erwähnt wurden die Testsubstanzen Glibenclamid und Nitro-L-Arginin gebraucht um einen Wirkungsmechanismus beurteilen zu können. Da die Wirkung von SWS8 bei der Aorta am stärksten war, wurde der Wirkungsmechanismus nur auf der Aorta ermittelt.

4.3.1 Wirkung von SWS 8 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf die Kontraktionskraft der Aorta

Tabellen 12 und 13:

Wirkung auf der Aorta bei 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamidzugabe und in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ SWS8 HCl

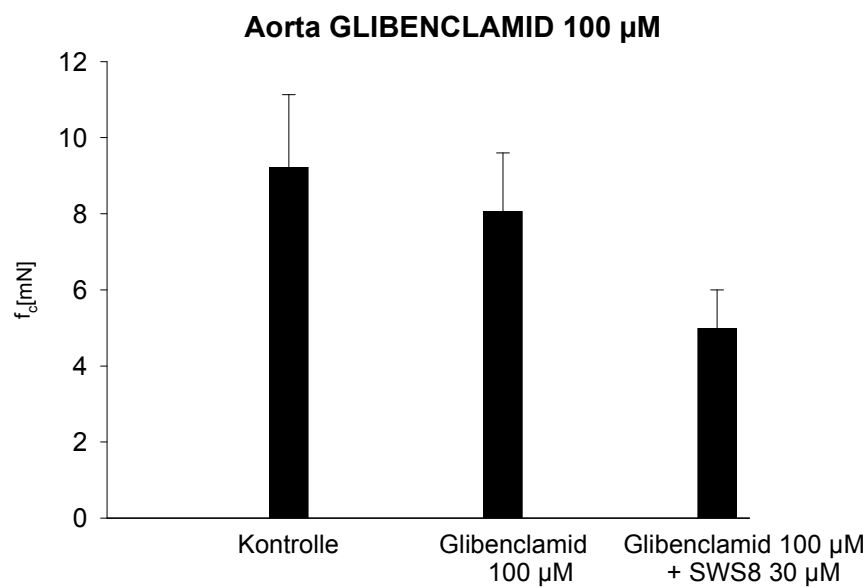
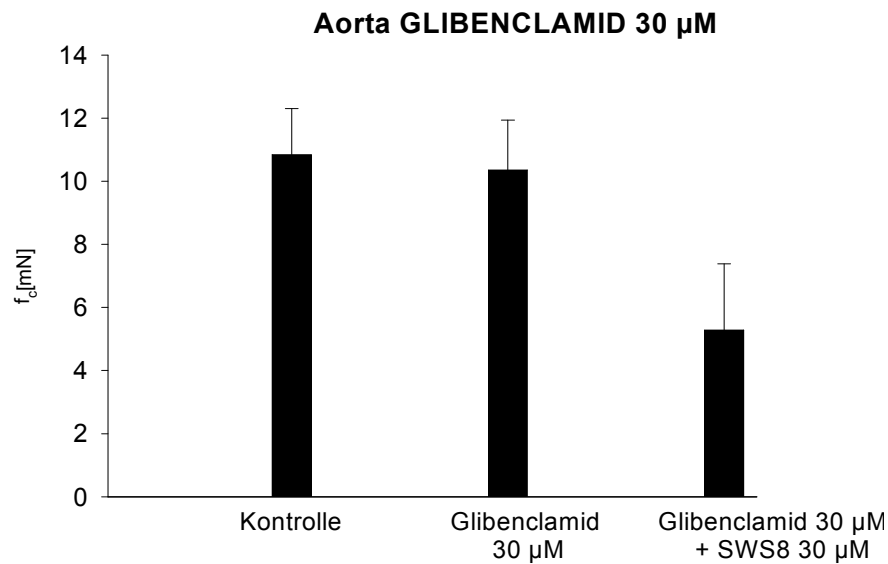
Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$10,84 \pm 1,46$	4	---
30 μmol Glibenclamid	$10,36 \pm 1,58$	4	----
30 μmol SWS8 HCl	$5,28 \pm 2,10$	4	0,05

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$9,21 \pm 1,92$	4	----
100 μmol Glibenclamid	$8,05 \pm 1,55$	4	----
30 μmol SWS8 HCl	$4,98 \pm 1,02$	4	0,05

Legende zu Tabelle 12 und 13:

Die Tabellen umfassen die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

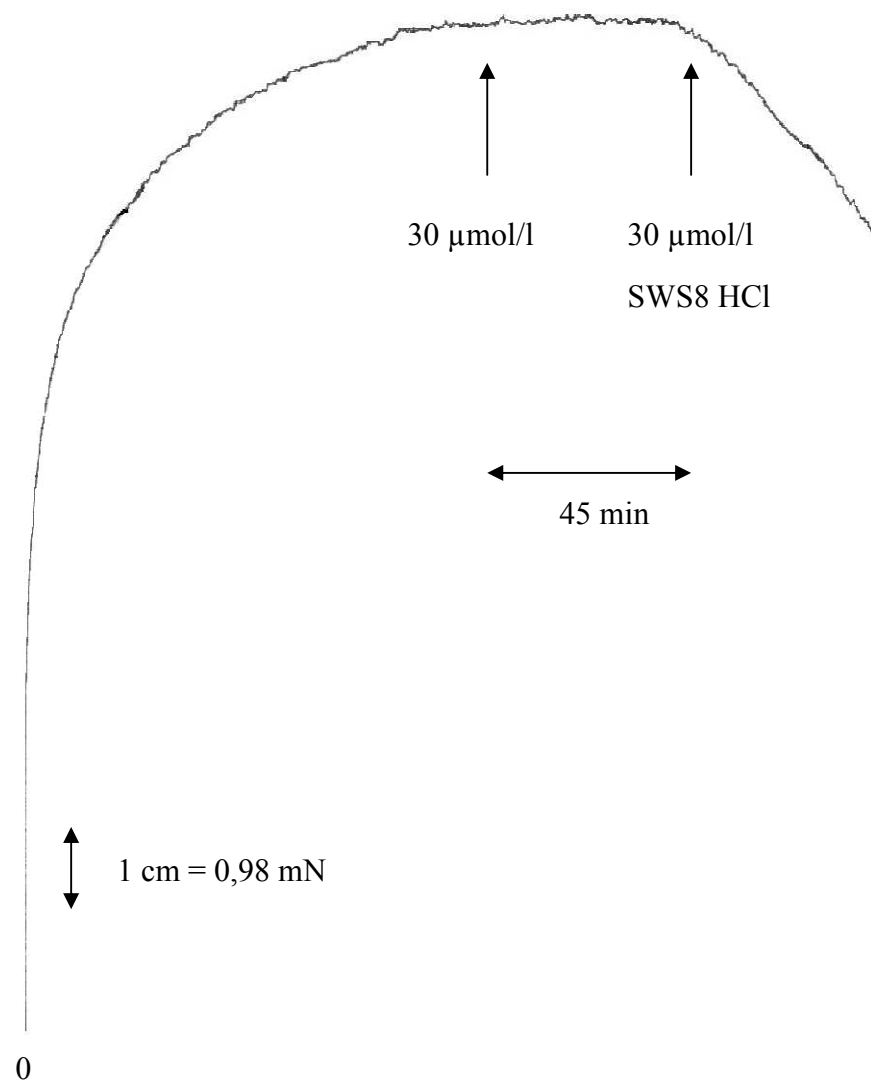
Diagramme 1 und 2: Graphische Darstellung der Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid bzw 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ SWS8 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta.

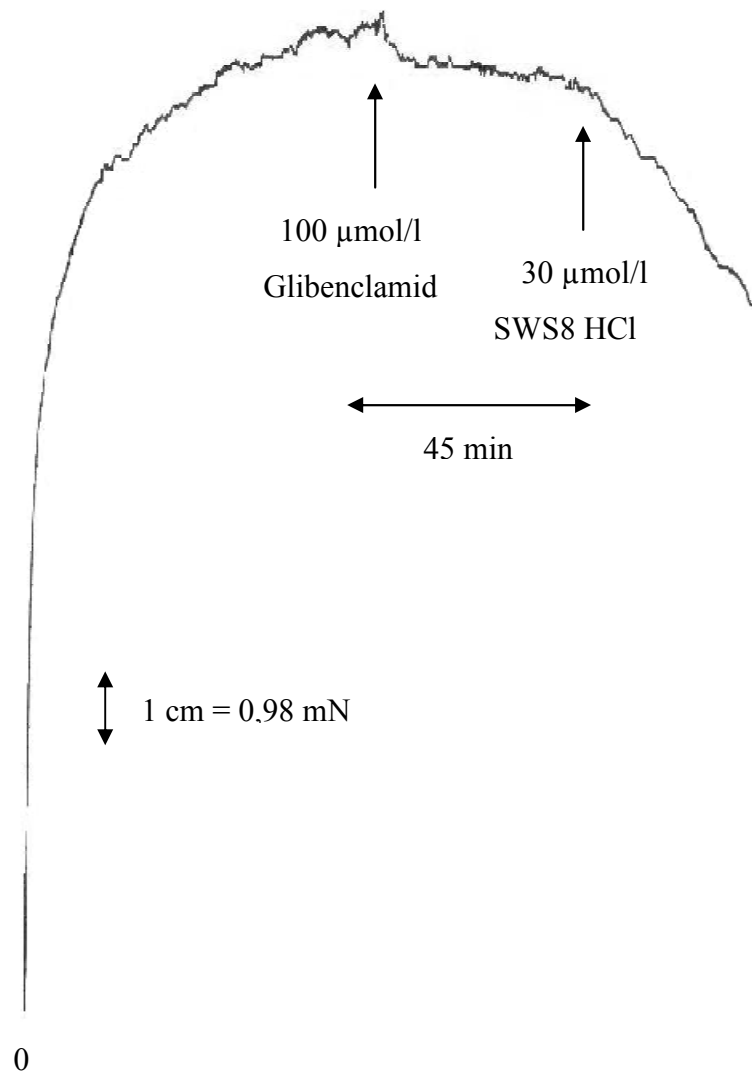


Legende zu den Diagrammen 1 und 2:

In diesen Diagrammen wird eine Veränderung der Kontraktilität der Aorta nach Zugabe von Glibenclamid veranschaulicht und die Durchschlagskraft beim zusätzlichen Hinzufügen der Testsubstanz SWS8 HCl auf die Aorta transparent gemacht.

Abbildungen 29 und 30: Originalaufzeichnung der Wirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 100 $\mu\text{mol/l}$ allein und in Kombination mit der untersuchten Testsubstanz an der Aorta.





Legende zu Abbildungen 29 und 30:

Die Abbildung 29 zeigt, dass es bei der Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid zu einer leichten Kontraktionszunahme kommt und bei der Zugabe von 30 μmol SWS8 HCl zu einer Dilatation der Aorta kommt. Bei der Abbildung 30 sieht man, dass die 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid zu einer leichten Abnahme der Kontraktion der Aorta und die 30 $\mu\text{mol/l}$ Testsubstanz wie bei der ersten Abbildung zur Dilatation führen. Die Pfeile stellen den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Beide Substanzen wurden in einem Abstand von 45 Minuten hinzugefügt.

4.3.2 Wirkung von SWS 8 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft der Aorta

Die Versuche wurden wie im Kapitel 3.8 durchgeführt. Durch die Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ SWS8 HCl wurde ermittelt ob die Wirkung von Nitro-L-Arginin aufgehoben wurde.

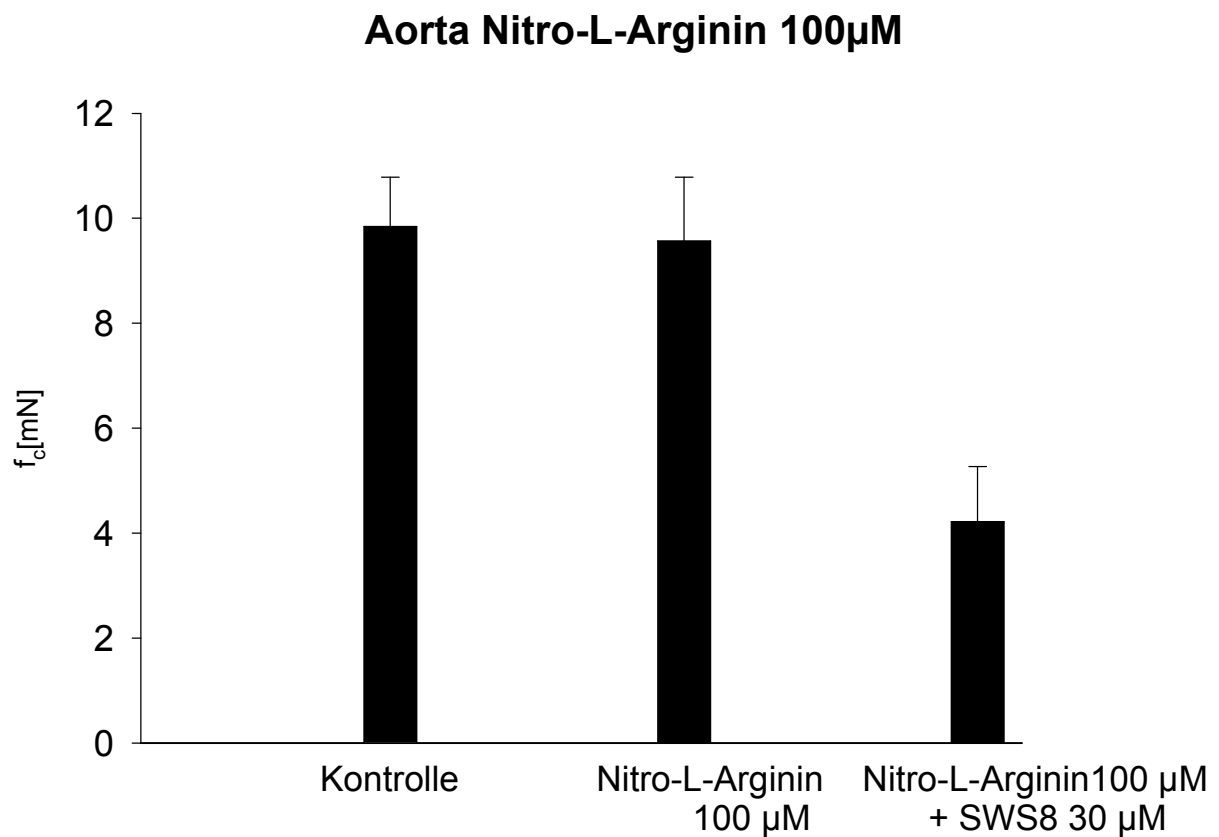
Tabelle 14: Wirkung auf die Aorta bei 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Argininzugabe in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ SWS8 HCl

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$9,84 \pm 0,94$	4	n.s.
100 μmol Nitro-L-Arginin	$9,57 \pm 1,21$	4	n.s.
30 μmol SWS8 HCl	$4,22 \pm 1,05$	4	0.05

Legende zu Tabelle 14:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

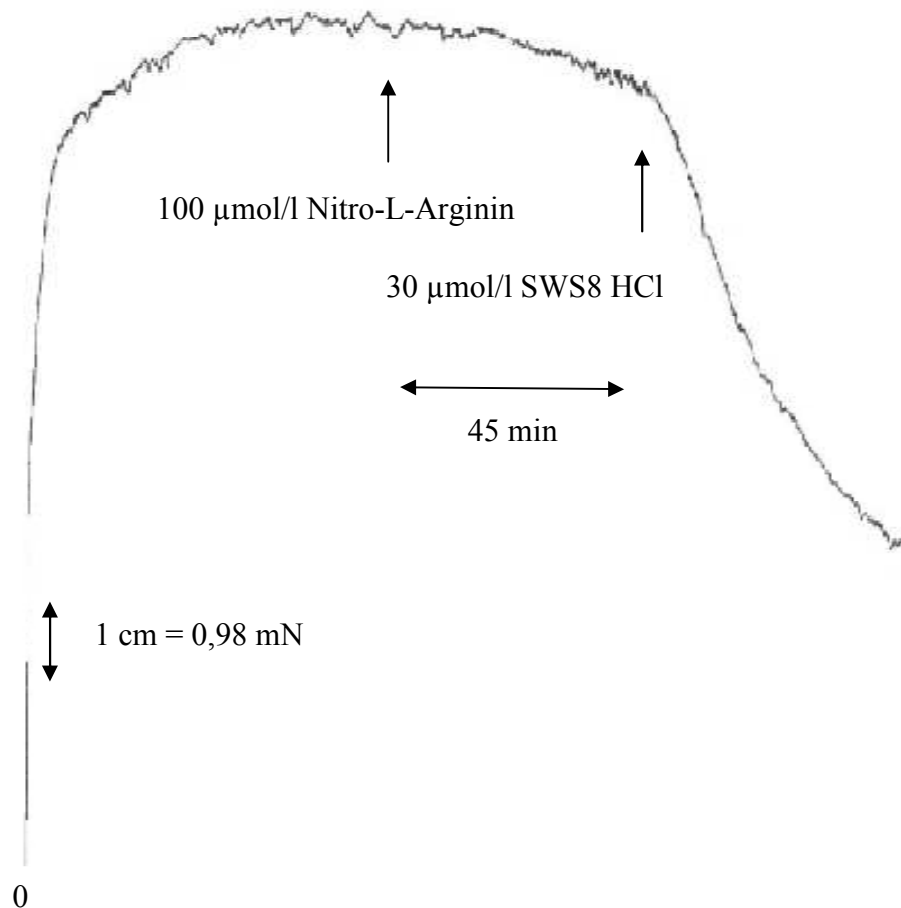
Diagramm 3 Graphische Darstellung der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ SWS8 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta.



Legende zu Diagramm 3:

In diesem Diagramm wird eine Veränderung der Kontraktilität der Aorta nach Zugabe von Nitro-L-Arginin veranschaulicht und die Durchschlagkraft beim Zusätzlichen Hinzufügen der Testsubstanz SWS8 HCl auf die Aorta transparent gemacht.

Abbildung 31: Originalaufzeichnung der Wirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin in Kombination mit der untersuchten Testsubstanz an der Aorta.



Legende zu Abbildung 31:

Die Abbildung 31 zeigt, dass es bei der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin zu einer leichten Kontraktionszunahme kommt und bei der Zugabe von 30 μmol SWS8 HCl zu einer Dilatation der Aorta kommt. Die Pfeile stellen den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Beide Substanzen wurden in einem Abstand von 45 Minuten hinzugefügt.

4.4 Untersuchung der Wirkungsmechanismus von SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta

Wie im Kapitel 3.9 schon erwähnt wurden die Testsubstanzen Glibenclamid und Nitro-L-Arginin, Phenylephrin und Histamin gebraucht um einen Wirkungsmechanismus beurteilen zu können. Da die Wirkung von SWS9 bei der Aorta am stärksten war, wurde der Wirkungsmechanismus nur auf der Aorta ermittelt.

4.4.1 Wirkung von SWS9 HCl in Kombination mit Glibenclamid auf die Kontraktionskraft der Aorta

Tabellen 15 und 16: Wirkung auf die Aorta bei 30 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamidzugabe und in Kombination mit 4 $\mu\text{mol/l}$ SWS9 HCl

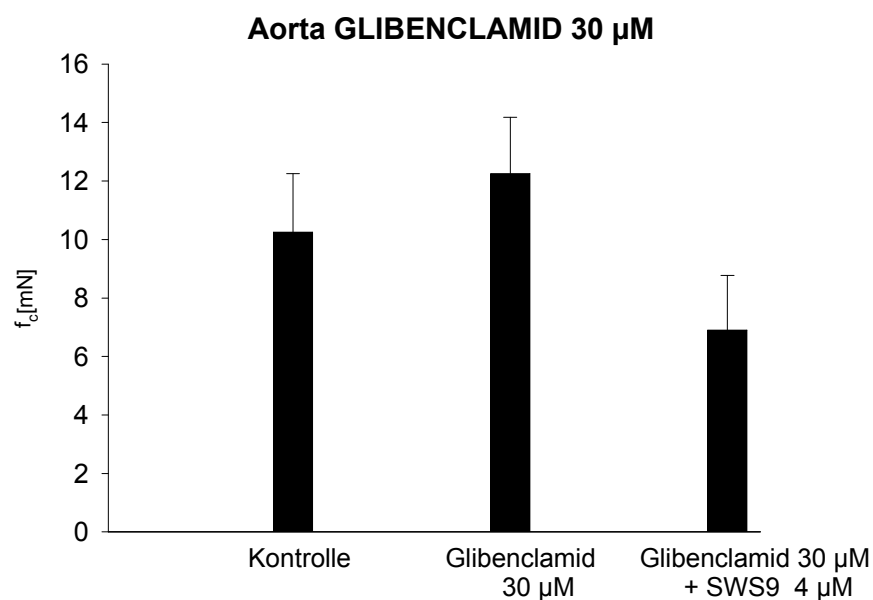
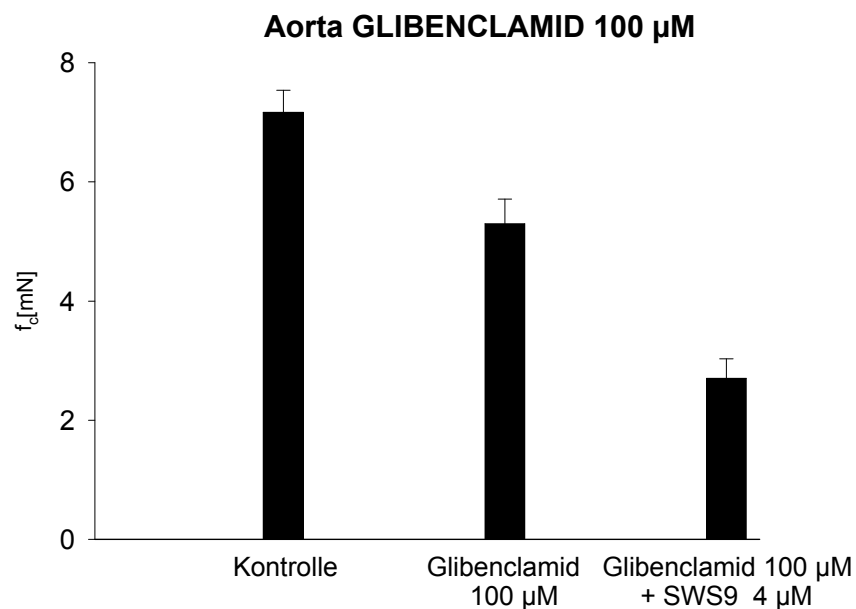
Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$10,25 \pm 2,03$	4	---
30 μmol Glibenclamid	$12,25 \pm 1,93$	4	----
30 μmol SWS8 HCl	$6,9 \pm 1,87$	4	0,05

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche n	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$7,17 \pm 0,37$	4	----
100 μmol Glibenclamid	$5,30 \pm 0,41$	4	----
30 μmol SWS8 HCl	$2,70 \pm 0,33$	4	0,05

Legende zu Tabellen 15 und 16:

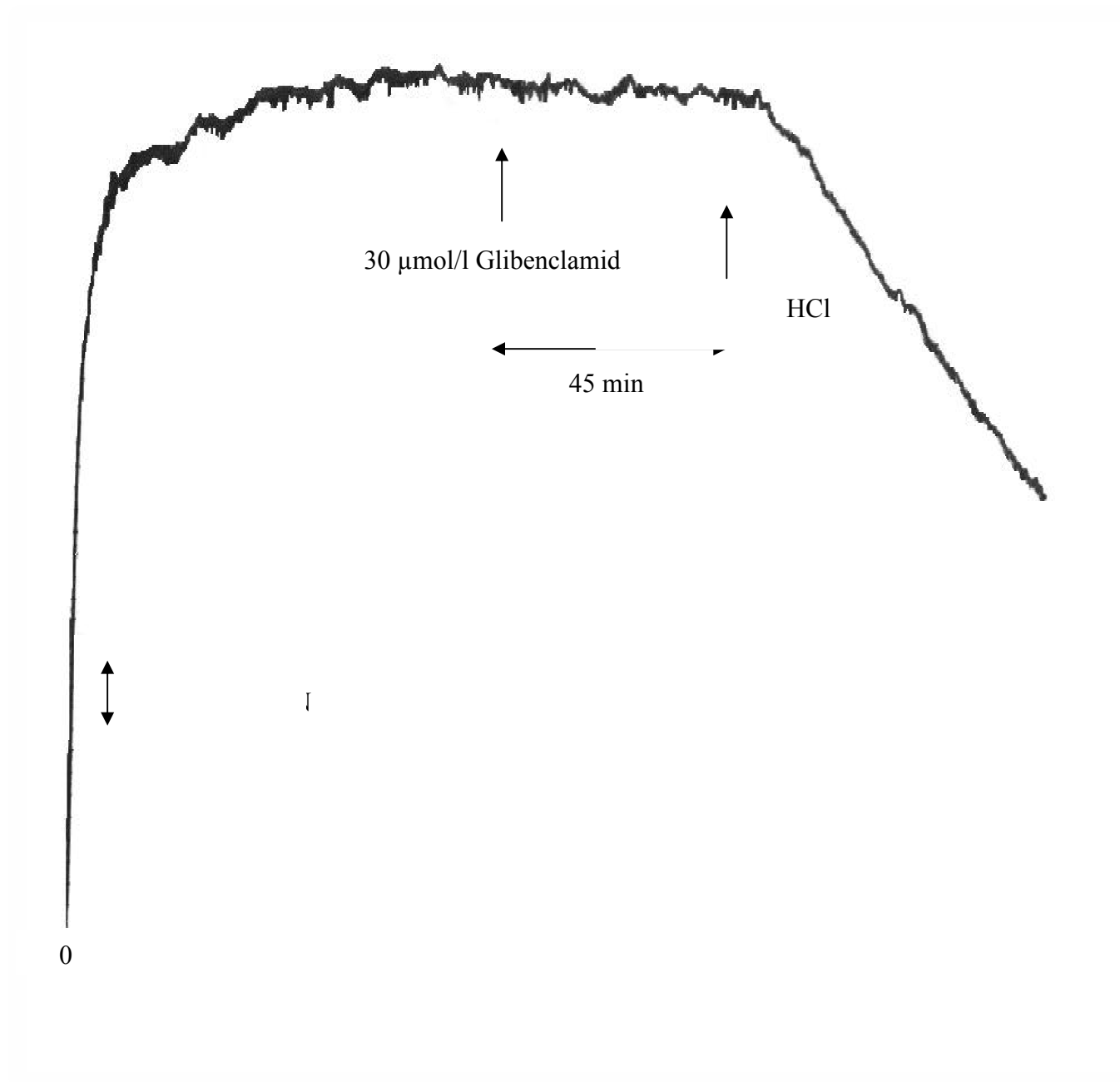
Die Tabellen umfassen die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

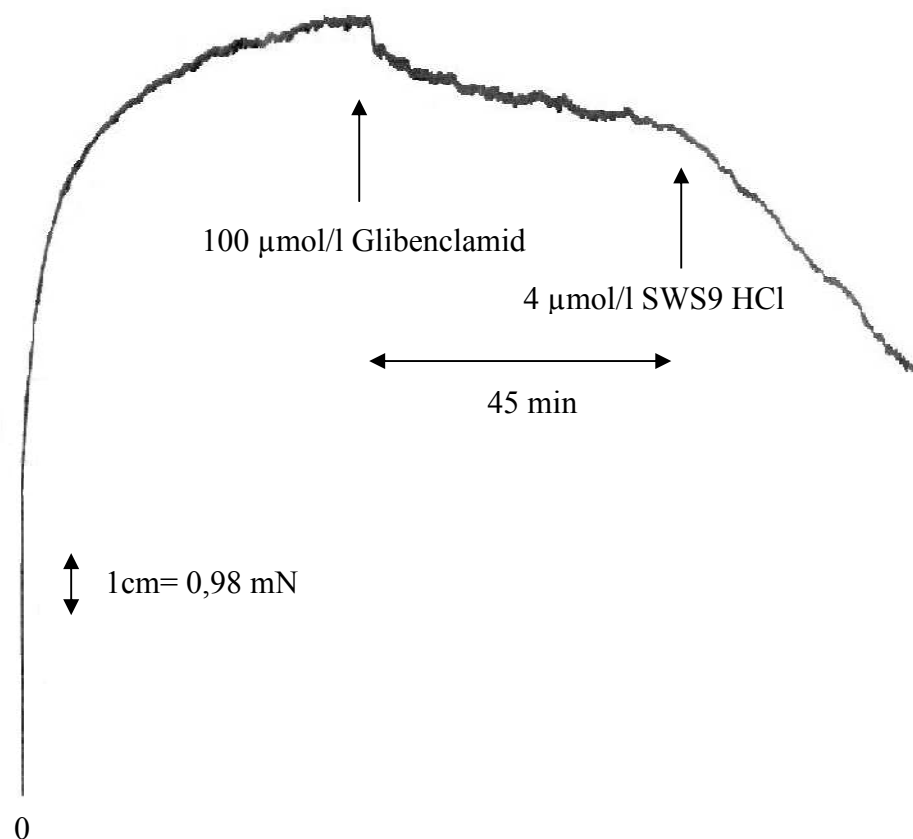
Diagramme 4 und 5: Graphische Darstellung der Zugabe von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid bzw 100 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid in Kombination mit 4 $\mu\text{mol/l}$ SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta



Legende zu den Diagrammen 4 und 5: In diesen Diagrammen wird eine Veränderung der Kontraktilität der Aorta nach Zugabe von Glibenclamid veranschaulicht und die Durchschlagskraft beim Zusätzlichen Hinzufügen der Testsubstanz SWS9 HCl auf die Aorta dargestellt.

Abbildung 32 und 33: Originalaufzeichnung der Wirkung von 30 $\mu\text{mol/l}$ Glibenclamid und 100 $\mu\text{mol/l}$ allein und in Kombination mit der untersuchten Testsubstanz an der Aorta.





Legende zu den Abbildungen 32 und 33:

Die Abbildung 32 zeigt, dass es bei der Zugabe von 30 µmol/l Glibenclamid zu einer leichten Kontraktionszunahme und bei der Zugabe von 4 µmol SWS9 HCl zu einer Dilatation der Aorta kommt. Bei der Abbildung 33 sieht man, dass die 100 µmol/l Glibenclamid zu einer leichten Abnahme der Kontraktion der Aorta und die 4 µmol/l Testsubstanz wie in der ersten Abbildung zur Dilatation führen. Die Pfeile stellen den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Beide Substanzen wurden in einem Abstand von 45 Minuten hinzugefügt.

4.4.2 Wirkung von SWS9 HCl in Kombination mit Nitro-L-Arginin auf die Kontraktionskraft der Aorta

Die Versuche wurden wie im Kapitel 3.9.2 durchgeführt. Durch die Zugabe von 4 µmol/l SWS9 HCl wurde ermittelt ob die Wirkung von 100 µmol/l Nitro-L-Arginin aufgehoben wurde.

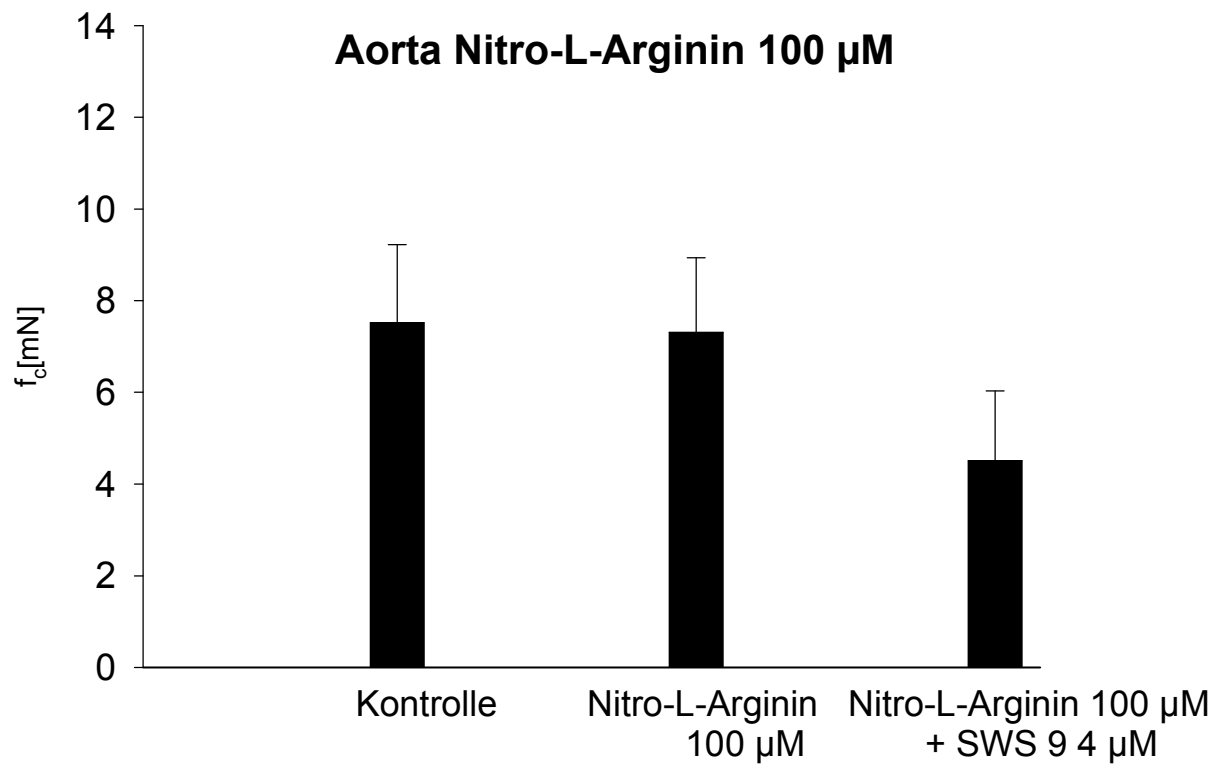
Tabelle 17: Wirkung auf die Aorta bei 100 µmol/l Nitro-L-Argininzugabe in Kombination mit 4 µmol/l SWS9 HCl

Konzentration (µmol/l)	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N	Irrtums- Wahrscheinlichkeit P
Kontrolle	$7,52 \pm 1,69$	3	n.s.
100 µmol Nitro-L-Arginin	$7,31 \pm 1,63$	3	n.s.
4 µmol SWS8 HCl	$4,51 \pm 1,52$	3	0.05

Legende zu Tabelle 17:

Die Tabelle umfasst die Anzahl der Versuche (n), die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardabweichung in % und mN, bezogen auf den Kontrollwert. Dargestellt wird auch die Irrtumswahrscheinlichkeit die für die Signifikanz der Abnahme der Kontraktion von Bedeutung ist.

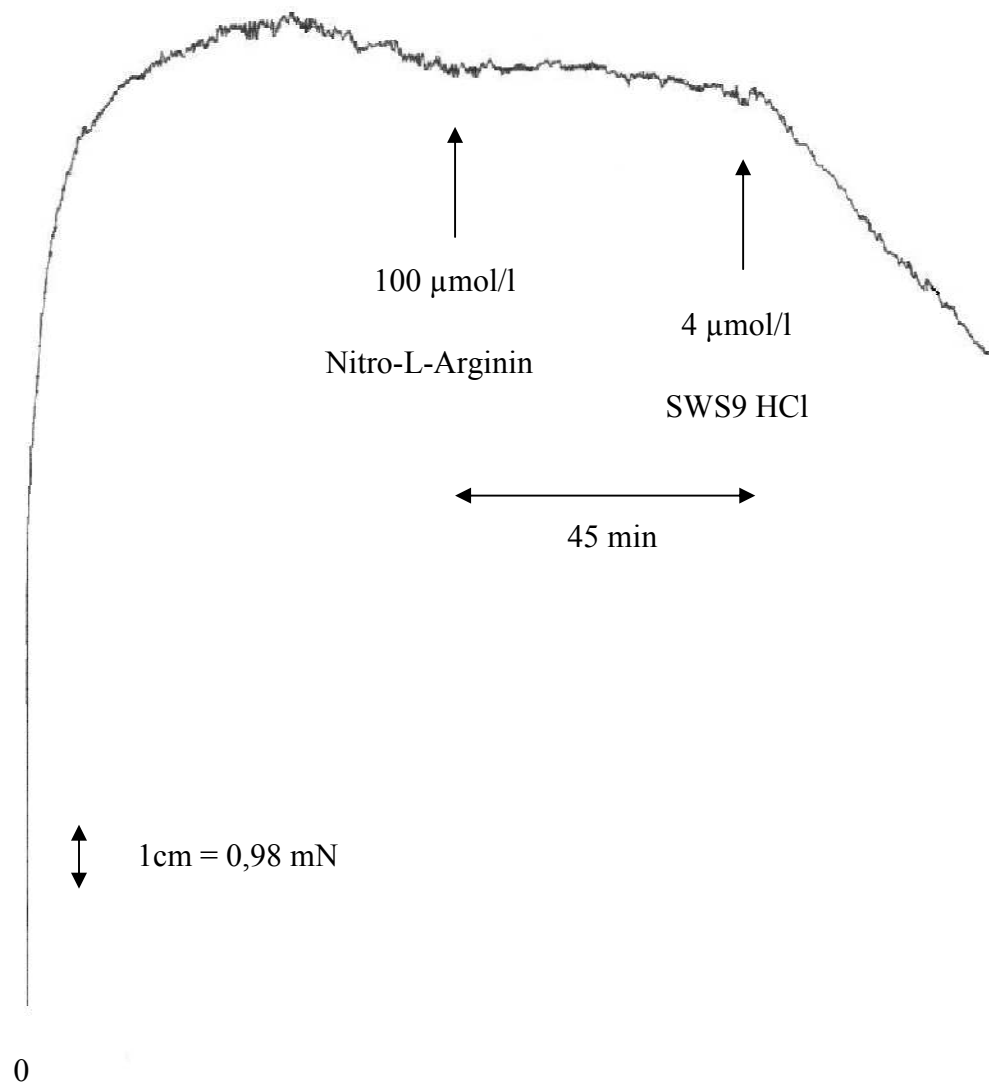
Diagramm 6: Graphische Darstellung der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin in Kombination mit 4 $\mu\text{mol/l}$ SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta.



Legende zu Diagramm 6:

In diesem Diagramm wird eine Veränderung der Kontraktilität der Aorta nach Zugabe von Nitro-L-Arginin veranschaulicht und die Durchschlagskraft beim zusätzlichen Hinzufügen der Testsubstanz SWS9 HCl auf die Aorta dargestellt.

Abbildung 34: Originalaufzeichnung der Wirkung von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin in Kombination mit der untersuchten Testsubstanz an der Aorta.



Legende zur Abbildung34:

Die Abbildung 34 zeigt, dass es bei der Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Nitro-L-Arginin zur eine leichten Kontraktionszunahme kommt und bei der Zugabe von 4 μmol SWS9 HCl zur eine Dilatation der Aorta kommt. Die Pfeile stellen den Zeitpunkt der Substanzzugabe dar. Beide Substanzen wurden in einem Abstand von 45 Minuten hinzugefügt.

4.4.3 Wirkung von SWS9 HCl in Kombination mit Phenylephrin auf die Kontraktionskraft der Aorta

Der Versuch wurde wie im Kapitel 3.9.3 durchgeführt.

Tabelle 18: Wirkung von Phenylephrin auf die Kontraktionskraft der Aorta

Phenylephrin HCl ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,1	$0,36 \pm 0,2$	3
0,3	$1,05 \pm 0,28$	3
1	$4,77 \pm 1,52$	3
3	$6,89 \pm 2,07$	3
10	$7,78 \pm 2,10$	3

Legende zu Tabelle 18:

Die Tabelle umfasst die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardfehlern aus drei durchgeführten Kontrollversuchen mit Phenylephrin. Dies sind Vergleichswerte zu den Versuchen Phenylephrin HCl in Kombination mit SWS9 HCl.

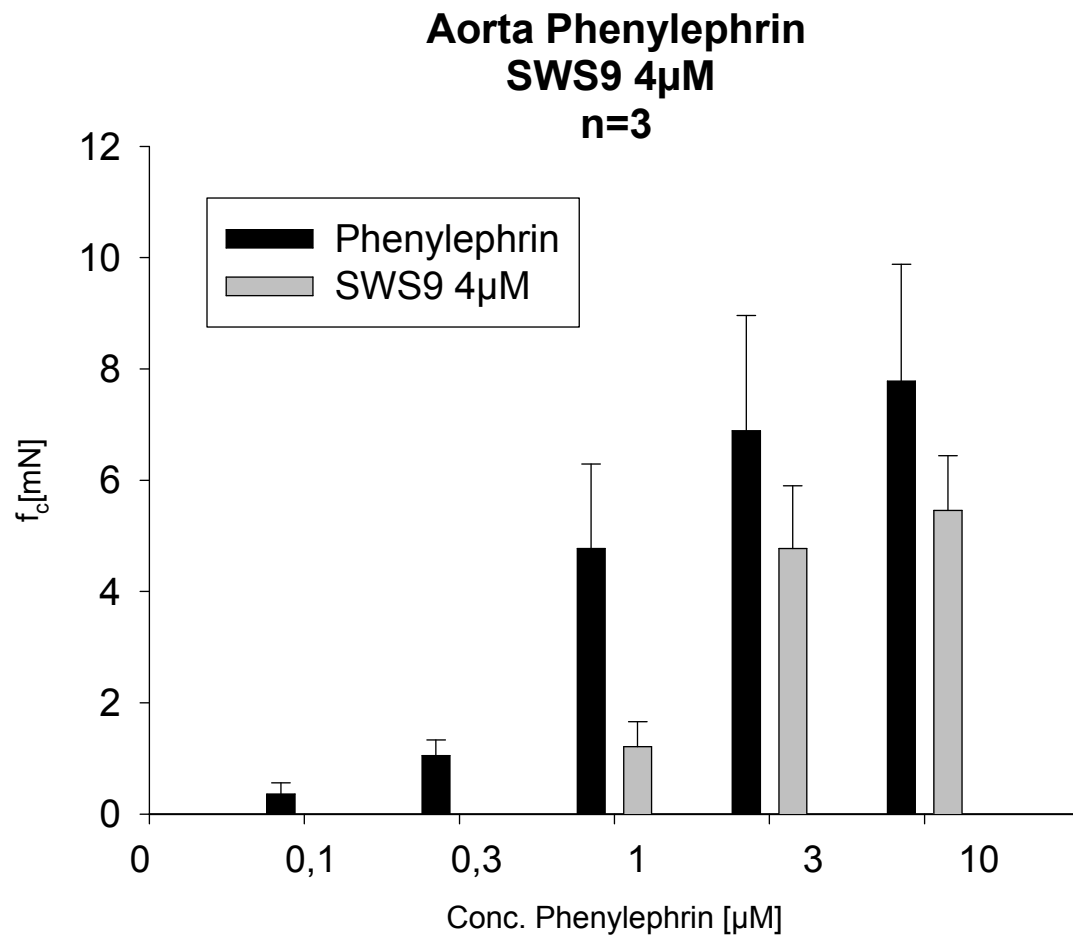
Tabelle 19: Wirkung von Phenylephrin in Kombination mit SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta

Phenylephrin HCl ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,1	0 ± 0	3
0,3	0 ± 0	3
1	$1,21 \pm 0,45$	3
3	$4,77 \pm 1,13$	3
10	$5,46 \pm 0,98$	3

Legende zu Tabelle 19:

Die Tabelle umfasst die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardfehlern aus drei durchgeführten Kontrollversuchen mit Phenylephrin HCl. Dies sind Vergleichswerte zu den Versuchen Phenylephrin HCl in Kombination mit SWS9 HCl.

Diagramm 7: Graphische Darstellung der Wirkung von Phenylephrin HCl in Kombination mit SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta

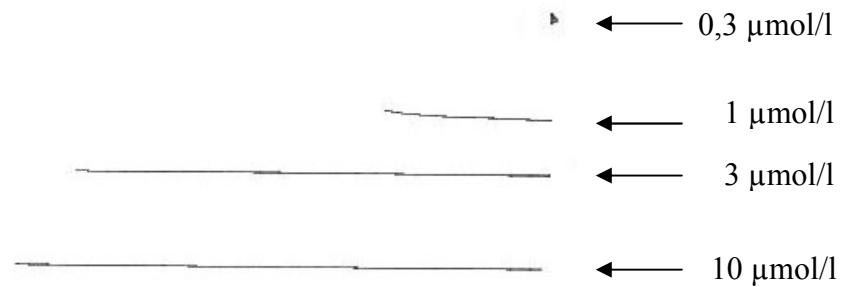


Legende zu Diagramm 7:

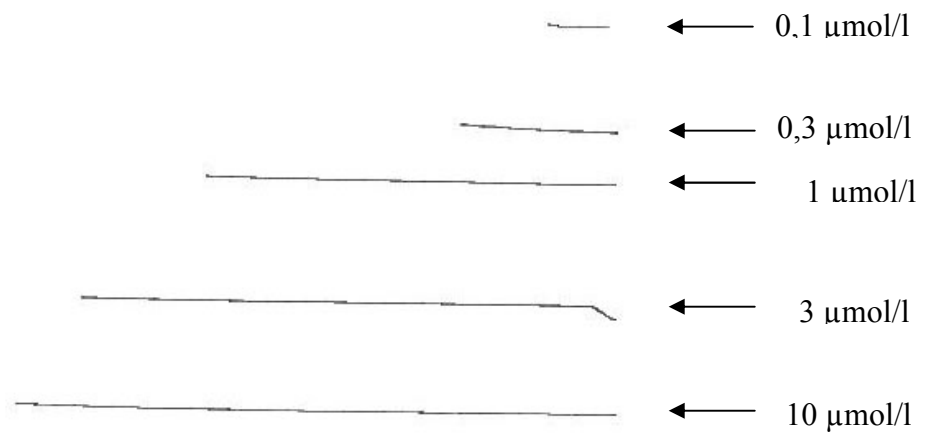
In diesem Diagramm wird eine leichte Veränderung der Kontraktilität der Aorta nach Zugabe von Phenylephrin HCl. Auf der Abszisse werden die Substanz- Konzentrationen in μ mol/l, auf der Ordinate die Konzentration in mN abgebildet. Die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardfehlern aus drei durchgeführten Kontrollversuchen mit Phenylephrin HCl und 4 μ mol/l SWS9 HCl werden als Balken und strichförmige Verlängerungen dargestellt.

Abbildung 35: Originalaufzeichnung der Wirkung von Phenylephrin HCl in Kombination mit der untersuchten Testsubstanz an der Aorta.

Messungen von SWS9 HCl:



Kontrollmessungen:



Legende zu Abbildung35:

Abbildung 35 zeigt die Originalaufzeichnung der Kontraktionsänderung während der Versuche. Zu sehen sind die Kontrollmessungen die mit Phenylephrin HCl durchgeführt wurden und die Messungen von SWS9 HCl in Kombination mit Phenylephrin HCl. Die Pfeile zeigen die Zugabe der verschiedenen Konzentrationen in Abstand von 10 Minuten. Die Linien verdeutlichen die Wirkung der Vergleichssubstanzen und Testsubstanzen auf die Kontraktionskraft der Aorta.

4.4.4 Wirkung von SWS9 HCl in Kombination mit Histamin auf die Kontraktionskraft der Aorta

Der Versuch wurde wie im Kpitel 3.9.3. durchgeführt.

Tabelle 20: Wirkung von Histamin auf die Kontraktionskraft der Aorta

Histamin ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,1	0 ± 0	3
0,3	$0,87 \pm 0,54$	3
1	$3,96 \pm 1,58$	3
3	$6,30 \pm 2,58$	3
10	$7,06 \pm 2,51$	3

Legende zu Tabelle 20.

Die Tabelle umfasst die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardfehlern aus drei durchgeführten Kontrollversuchen mit Histamin. Dies sind Vergleichswerte zu den Versuchen Histamin in Kombination mit SWS9 HCl.

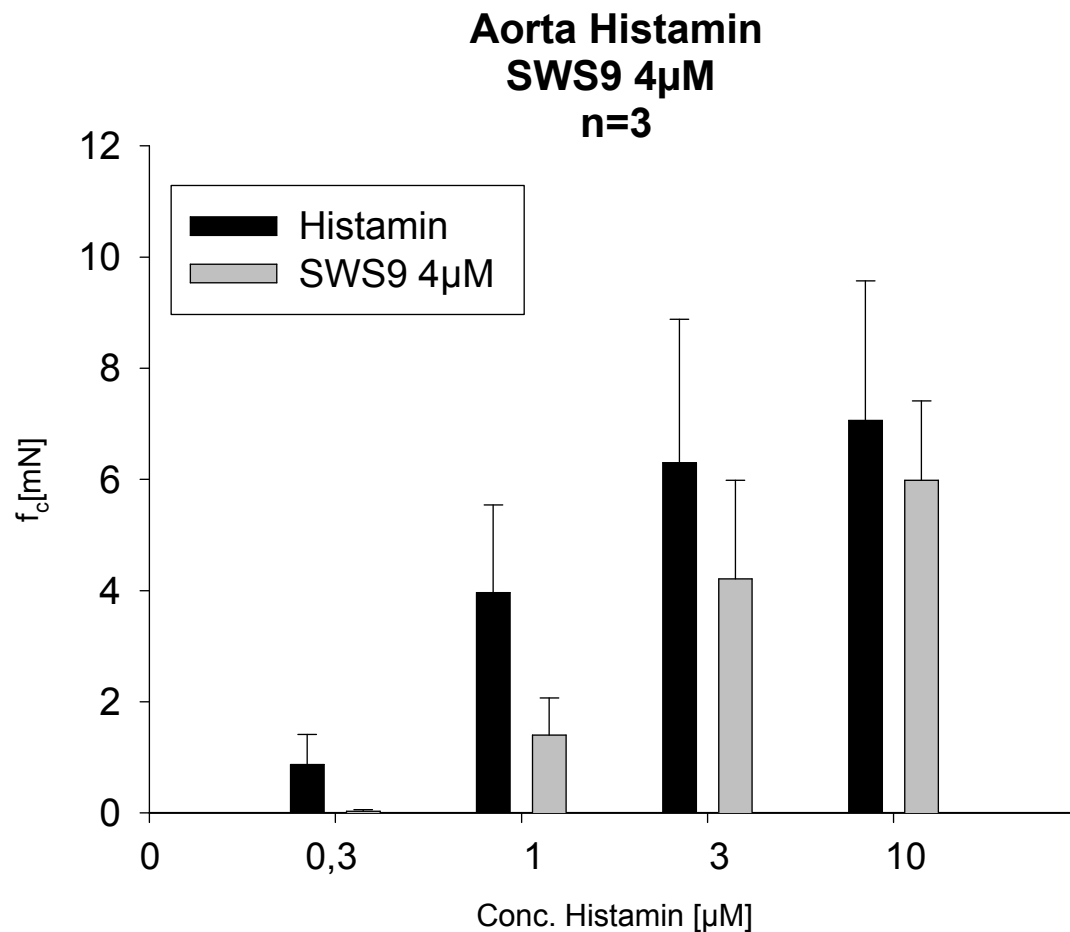
Tabelle 21: Wirkung von Histamin in Kombination mit SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta

Histamin ($\mu\text{mol/l}$) Kontrolle	$f_c \pm \text{SEM}$ (mN)	Anzahl der Versuche N
0,1	0 ± 0	3
0,3	$0,03 \pm 0,03$	3
1	$1,40 \pm 0,67$	3
3	$4,21 \pm 1,77$	3
10	$5,98 \pm 1,43$	3

Legende zu Tabelle 21:

Die Tabelle umfasst die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardfehlern aus drei durchgeführten Kontrollversuchen mit Histamin. Dies sind Vergleichswerte zu den Versuchen Histamin in Kombination mit SWS9 HCl.

Diagramm 8: Graphische Darstellung der Wirkung von Histamin in Kombination mit SWS9 HCl auf die Kontraktionskraft der Aorta

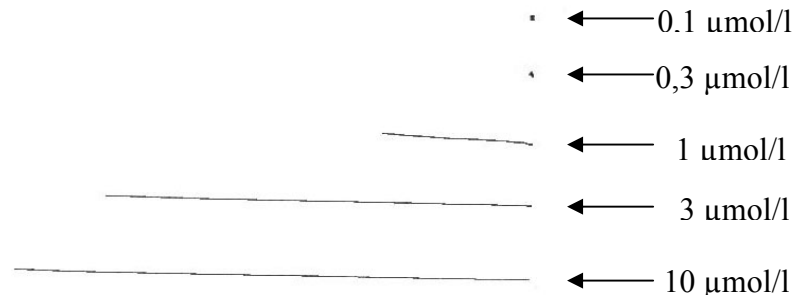


Legende zu Diagramm 8:

In diesem Diagramm wird eine leichte Veränderung der Kontraktilität der Aorta nach Zugabe von Histamin. Auf der Abszisse werden die Substanz- Konzentrationen in μ mol/l, auf der Ordinate die Konzentration in mN abgebildet. Die arithmetischen Mittelwerte der Kontraktion der Aorta und deren Standardfehlern aus drei durchgeführten Kontrollversuchen mit Histamin und 4 μ mol/l SWS9 HCl werden als Balken und strichförmige Verlängerungen dargestellt.

Abbildung 36: Originalaufzeichnung der Wirkung von Histamin in Kombination mit der untersuchten Testsubstanz an der Aorta.

Messung von SWS9 HCl:



Kontrollmessungen:



Legende zu Abbildung36:

Abbildung 36 zeigt die Originalaufzeichnung der Kontraktionsänderung während der Versuche. Zu sehen sind die Kontrollmessungen die mit Histamin durchgeführt wurden und die Messungen von SWS9 HCl in Kombination mit Histamin. Die Pfeile zeigen die Zugabe der verschiedenen Konzentrationen in Abstand von 10 Minuten. Die Linien verdeutlichen die Wirkung der Vergleichssubstanzen und Testsubstanzen auf die Kontraktionskraft der Aorta.

5. Diskussion

In dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung von zwei neu synthetisierten Substanzen SWS8 HCl und SWS9 HCl an verschiedenen isolierten Organen von Meerschweinchen untersucht. Diese beiden Substanzen unterscheiden sich lediglich durch eine Methylgruppe an Position 2 des Imidazolrings (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2.). Zunächst wurden die Substanzen hinsichtlich ihrer inotropen und chronotropen Wirkung getestet. Die Zugabe der Verbindung ohne Methylgruppe SWS8 HCl führte zu einer geringen negativ chronotropen Wirkung, die bis zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ nicht signifikant war. Die Zugabe der gleichen Substanz in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ führte zur einer Abnahme der Schlagfrequenz um $36,97\% \pm 7,97\%$ ($n=5$, $P<0,05$). Das methylierte Derivat SWS9 HCl zeigte am rechten Vorhof einen negativ chronotropen Effekt mit einer EC_{50} von 15,6 $\mu\text{mol/l}$. Hinsichtlich der Inotropie kam es genau zum gegenteiligen Effekt. Hier führte SWS8 HCl zu einer Abnahme der Kontraktionskraft am Papillarmuskel mit einem EC_{50} Wert von 30 $\mu\text{mol/l}$, während SWS9 HCl bis zu einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ keine signifikante Wirkung zeigte. Eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ führte zu einer Reduktion der Kontraktionskraft um $16,73\% \pm 7,57\%$ ($n=5$ $P<0,05$). Aufgrund dieser Ergebnisse an den Herzmuskelpräparaten kann auf keine Struktur-Wirkungs-Beziehung geschlossen werden.

Beide Verbindungen wurden in weiteren Versuchsreihen an der glatten Muskulatur untersucht. Dabei handelte es sich um terminale Ilea und Gefäße wie z.B. Aorta und Arteria pulmonalis. Am terminalen Ileum führte SWS9 HCl zur einem 2,5fach stärkeren spasmolytischen Effekt als SWS8 HCl. Die EC_{50} Werte sind aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich.

Substanzen	EC_{50} -Werte
SWS8 HCl	40 $\mu\text{mol/l}$
SWS9 HCl	16 $\mu\text{mol/l}$

Somit könnte es durch die Einführung der Methylgruppe in den Imidazolring zu einer Verstärkung der spasmolytischen Wirkung kommen. Um diese Hypothese zu bestätigen wurden die beiden Substanzen an vaskulären Präparaten untersucht.

Wie schon an der glatten Muskulatur des terminalen Ileums demonstriert wurde, erwies sich

SWS9 HCl auch an der Gefäßmuskulatur als die stärker wirksame Verbindung. Der Effekt von SWS9 HCl an der Aorta war mit einer 6fach stärkeren Wirkung und an der Arteria pulmonalis mit einer 5fach stärkeren Wirkung im Vergleich zu SWS8 HCl noch deutlicher ausgeprägt als jener am terminalen Ileum.

Substanzen	EC ₅₀ -Werte
SWS8 HCl	20,1 µmol/l
SWS9 HCl	3,35 µmol/l

In der oben angeführten Tabelle sind die graphisch ermittelten EC₅₀-Werte für die Versuche an der Aorta dargestellt.

Substanzen	EC ₅₀ -Werte
SWS8 HCl	63 µmol/l
SWS9 HCl	12,7 µmol/l

In dieser Tabelle sind die EC₅₀-Werte an der Arteria pulmonalis angeführt.

Auch an der Gefäßmuskulatur konnte somit gezeigt werden, dass es sich bei dem methylierten Derivat SWS9 HCl um die wesentlich stärkere wirkende Verbindung handelt.

Zur Aufklärung eines möglichen Wirkmechanismus wurden verschiedene Vergleichssubstanzen verwendet. Um den Einfluss von α -Adrenozeptoren bzw Histaminrezeptoren zu untersuchen, wurden Phenylephrin und Histamin eingesetzt. Möglicherweise sind an der Vasodilatation auch K_{ATP}-Kanäle involviert. Deshalb wurden die Gefäßpräparate mit Glibenclamid, einem K_{ATP}-Kanalblocker, vorbehandelt. Um die Rolle von NO bei der Gefäßerweiterung zu untersuchen wurde Nitro-L-Arginin verwendet.

Histamin wurde alleine sowie in Gegenwart von 4 µmol/l SWS9 HCl an der Aorta untersucht. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede. Somit scheinen Histaminrezeptoren keine Bedeutung am Zustandekommen der vasodilatierenden Wirkung zu haben.

Ähnliche Versuche wurden auch mit dem α -Sympathomimetikum Phenylephrin durchgeführt. Die untersuchte Konzentration von SWS9 HCl betrug wiederum 4 µmol/l. SWS9 HCl zeigte eine geringe α -adrenozeptorblockierende Wirkung.

Aus diesen Versuchen kann man schließen, dass an der gefäßerweiternden Wirkung von SWS9 HCl noch weitere Mechanismen beteiligt sein müssen.

Bei der Gefäßerweiterung spielt NO eine bedeutende Rolle. Im vaskulären System wird NO durch die NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin synthetisiert. Diese Synthese erfolgt im Endothel der Blutgefäße (Moncada and Higgs 2006). NOS aktiviert cGMP und zeigt somit verschiedene Effekte, wie den Anstieg von intrazellulärem GMP. Dadurch kommt es zu einer Hemmung des Ca-Einstroms in die Zelle und zu einem Abfall der intrazellulären Ca-Konzentration. Ein weiterer Effekt besteht in der Aktivierung von K-Kanälen, die zu einer Hyperpolarisation und somit zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führt. Insbesondere kommt der endothelialen NO-Synthase (eNOS) eine große Bedeutung zu. Die eNOS ist ein interessantes pharmakologisches Target, weil ihre Aktivierung eine Vasodilatation verursacht und so den Blutdruck senkt. Ebenso hat H₂S eine Bedeutung im vaskulären System, weil es teilweise an der Regulation der Verfügbarkeit von NO beteiligt sein könnte (Ali et al. 2006).

Möglicherweise könnten die beiden Testsubstanzen (SWS8 HCl und SWS9 HCl) NO aus den endothelialen Zellen der Gefäße freisetzen. Um diese Annahme zu beweisen, wurden die Substanzen in Gegenwart von 100 µmol/l Nitro-L-Arginin untersucht. Sowohl SWS8 HCl als auch SWS9 HCl führten zu einer Vasodilatation der Aorta. Somit könnte dieser Effekt zumindest teilweise durch endotheliale NO-Freisetzung zustande kommen.

Neben NO wurde auch Schwefelwasserstoff als bioaktives Molekül entdeckt. Während NO hauptsächlich über die Aktivierung des cGMP-Pfads wirkt, beruht die vasodilatierende Wirkung von H₂S vorwiegend auf der Öffnung der K_{ATP}- Kanäle (Zhao et al 2001). Wie man aus der chemischen Struktur der beiden Substanzen ablesen kann, enthalten beide Derivate Schwefelatome. In wässriger Lösung könnte somit durch Spaltung der Moleküle H₂S entstehen. Dieser Hypothese zugrundeliegend, wurden deshalb die beiden Verbindungen hinsichtlich ihrer K-Kanal öffnenden Eigenschaften im Vergleich mit Glibenclamid, einem K_{ATP}-Blocker, untersucht. In der Studie von Zhao (2001) bewirkte H₂S eine Vasodilatation der Aorta von Ratten, die mit 20 mmol/l Kaliumchlorid vorkontrahiert wurde. Diese H₂S induzierte Vasodilatation wurde durch hohe Konzentrationen von Tetraethylammonium, welches viele K-Kanäle in vaskulären glatten Muskelzellen wie K_{Ca}⁻, K_V- und K_{ATP}-Kanäle blockiert, aufgehoben. Verschiedene Blocker von K_{Ca}⁻ oder K_V-Kanälen konnten die vaskulären Effekte von H₂S nicht aufheben, was wiederum ein Beweis dafür ist, dass der K_{ATP}-Kanal ein wahrscheinliches Target von H₂S ist (Nelson und Quayle, 1995). Außerdem konnte die hypotensive Wirkung von H₂S auch in vivo durch K_{ATP}-Kanalblocker aufgehoben

werden (Zhao et al 2001). Der modulierende Effekt von H_2S auf K_{ATP} -Kanäle kann durch eine direkte Interaktion von H_2S und K-Proteinkanälen erklärt werden. H_2S könnte eine Abnahme der Disulfidketten der K_{ATP} -Kanalproteine induzieren (Warencya et al 1989).

Kerbler 2008 untersuchte die Wirkung von gasförmigen H_2S auf die thorakale Aorta von Meerschweinchen. Dabei kam es zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation mit einem EC_{50} -Wert von $107 \mu\text{mol/l}$. Neben diesem vasodilatierenden Effekt wurde auch noch eine mögliche kardioprotektive Wirkung von H_2S nachgewiesen. Dieser Effekt wurde sowohl an isolierten Myocyten, die aus dem Herz von Ratten nach einem Isoproterenol induzierten Myokardinfarkt gewonnen wurden (Geng et al 2004), als auch in vivo an Ratten mit Myokardinfarkt nach Behandlung mit NaHS gezeigt. Der exakte Mechanismus dieser kardioprotektiven Wirkung muss noch untersucht werden (Zhu et al 2006).

SWS8 HCl und SWS9 HCl wurden in einer Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ und $4 \mu\text{mol/l}$ in Anwesenheit von Glibenclamid (30 - und $100 \mu\text{mol/l}$) an der Aorta von Meerschweinchen getestet. Dabei zeigten beide Testsubstanzen eine Vasodilatation, die durch vorherige H_2S Abspaltung zustande kommen könnte, welche durch K-kanalöffnende Eigenschaften der Verbindungen induziert wurde.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide Testsubstanzen trotz einer nicht eindeutigen Gewebespezifität an der glatten Muskulatur wirksam waren, sich jedoch hinsichtlich ihrer Wirkstärke deutlich voneinander unterschieden. SWS9 HCl erwies sich an der Gefäßmuskulatur besonders potent. Diese Wirkung scheint allerdings nicht nur durch einen, sondern durch mehrere Wirkmechanismen bedingt zu sein. Einerseits scheinen α -adrenozeptorblockierende Effekte, andererseits auch NO- und H_2S -vermittelte Effekte beteiligt zu sein. Welcher Wirkmechanismus vorherrschend ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

In dieser Diplomarbeit wurden zwei neu synthetisierten möglichen H₂S Donatoren, SWS8 HCl und SWS9 HCl hinsichtlich ihrer Wirkstärke und Wirkung an isolierten Organen untersucht. Es wurden sowohl Herzmuskelpräparate (Papillarmuskel, rechter Vorhof) als auch glatte Muskelpräparate (terminale Ilea, Aortaringe und Arteria pulmonalis-Ringe) untersucht. An den Herzmuskelpräparaten wurde eine inotrope bzw chronotrope Wirkung, an den terminalen Ilea ein möglicher spasmolytischer und an der Gefäßmuskulatur ein vasodilatierender Effekt getestet. Während der Versuche befanden sich alle Präparate in einer Krebs-Henseleit-Lösung, die mit Oxymix durchperlt wurde. Die Temperatur lag bei 35 bzw 36 ± 1 Grad Celsius. An den isolierten Organen wurde eine Vorspannung angelegt, damit ein konstanter Muskeltonus während der Versuche erhalten blieb. Die Papillarmuskeln wurden elektrisch mit einer Frequenz von 1 Hz gereizt, die Vorhöfe waren spontan aktiv und die glatten Muskelpräparate wurden mit einer Kaliumchloridlösung vorkontrahiert. Diese betrug 60 mmol/l für die terminalen Ilea und 90 mmol/l für die Aorten und die Arteria pulmonalis-Ringe. Nach einer Kontrollperiode wurden die Testsubstanzen in 45minütigen Abständen kumulativ in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30 und 100 µmol/l der Badlösung zugegeben. SWS8 HCl bewirkte eine geringe, jedoch nicht signifikante, chronotrope Wirkung am rechten Vorhof. Am Papillarmuskel kam es zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktionskraft mit einem EC₅₀ Wert von 30 µmol/l. Die Wirkung an der glatten Muskulatur war signifikant. Bei der terminalen Ilea lag der EC₅₀ Wert bei 40 µmol/l, bei der Aorta bei 20,1 µmol/l und bei der Arteria pulmonalis bei 63 µmol/l. SWS9 HCl mit einem EC₅₀ Wert von 15,6 µmol/l bewirkte am rechten Vorhof eine Reduktion der Schlagfrequenz, am Papillarmuskel hingegen war kein signifikanter Effekt feststellbar. An der glatten Muskulatur wurde eine signifikante Wirkung beobachtet, die in Vergleich zu SWS8 HCl jedoch wesentlich stärker ausgeprägt war. Die EC₅₀ für die terminale Ilea betrug 16 µmol/l, für die Aorta 3,35 µmol/l und für die Arteria pulmonalis 12,7 µmol/l. Zur Aufklärung eines möglichen Wirkungsmechanismus wurden beide Substanzen in Anwesenheit von Glibenclamid einem K_{ATP}-Kanalblocker und Nitro-L-Arginin, einem Blocker der endothelialen NO-Synthase untersucht. SWS9 HCl wurde zusätzlich auf eine mögliche α-sympatholytische Wirkung mit Phenylephrin, einem α-Sympathomimetikum, als Vergleichssubstanz, sowie auf eine histaminerge Wirkung mit Histamin als Vergleichssubstanz getestet. An der Wirkung der beiden Substanzen scheinen mehrere Wirkmechanismen beteiligt zu sein. Zum einen ein K_{ATP}-Kanalöffnender, zum

anderen ein NO freisetzender Effekt. Zusätzlich könnte bei SWS9 HCl noch eine α -Blockade eine Rolle spielen.

7. Literaturverzeichnis

Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16: 1066-1071.

Ali MY, Ping CY, Mok Y-YP, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK (2006) Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol* 149: 625-634.

Bansinath M, Arbabha B, Turndorf H, Garg U C (1993) "Chronic administration of a nitric oxide synthase inhibitor, N omega-nitro-L-arginine, and drug-induced increase in cerebellar cyclic GMP in vivo". *Neurochem Res* 18 (10): 1063-6.

Cooper DW, Mowbray P (2004) Advantages of using a prophylactic phenylephrine infusion during spinal anaesthesia for caesarean section. *Int J Obst Anest* 13: 124-125.

Forth W, Henschler D, Rummel W, Förster (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10 Auflage, Elsevier München.

Geng B , Chang L, Pan C, QiY, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C (2004) Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 756-763.

Hosoki R, Matsuki N and Kimura H (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide *Biochemie Biophys Res Commun* 237: 527-531.

Ji Y, Pang QF, Xu G, Wang L, Wang JK, Zeng YM (2008) Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 587: 1-7.

Koch-Weser J (1963) Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle *Am J Physiol* 204: 451-457.

Kerbler (2008) Pharmacological profile of newly synthesized thioamides: smooth muscle relaxation via NO-release and α -adrenoceptor inhibition Diplomarbeit.

Laggner H, Herman M, Esterbauer H, Muellner MK, Exner M, Gmeiner BMK, Kapiotis S (2007). The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulphide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells *J Hypertens* 25: 2100-2104.

- Moncada S, Higgs EA (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 147: 193-201.
- Nelson MT and Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268: C799-C822.
- Reiter M (1967) Die Wertbestimmung inotrop wirkender Arzneimittel am isolierten Papillarmuskel. *Arzneim Forsch* 17: 1249-1253.
- Reslerova M and Loutzenhiser R (1998) Renal microvascular actions of calcitonin gene-related peptide *Am J Physiol* 274: F1078-F1085.
- Rossoni G, Saporatore A, Tazzari V, Manfredi B, Del Soldato P, Berti F (2007) The hydrogen sulphide-releasing derivative of diclofenac protects against ischaemia-reperfusion injury in the isolated rabbit heart. *Br J Pharmacol* 153: 100-109.
- Sitapunk MH and Beck PW (1982) Characterization of the enzyme capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat *Biochem J* 206: 267-277.
- Smith RP and Gosselin RE (1979) Hydrogen sulfide poisoning *J Occup Med* 21: 93-97.
- Szilvassay J, Jansco G and Ferdinandy P (1999) Mechanismus of vasodilatation by cochlear nerve stimulation Role of calcitonin gene-related peptide *Pharmacol Res* 39: 217-220.
- Wang R (1998) Resurgence of carbon monoxide an endogenous gaseous vasorelaxing factor *Can J Physiol Pharmacol* 76: 1-15.
- Warencya MW, Steel JA, Karpinski E and Reiffenstein RJ (1989) Hydrogen sulfide in combination with taurine or cysteic acid reversibly abolishes sodium currents in neuroblastoma cells *Neurotoxicol* 10: 191-199.
- Wang R, Wang ZZ and Wu L (1997a) Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanism *Br J Pharmacol* 121: 927-934.
- Wang R, Wu L and Wang ZZ (1997b) The direct Effect of carbon monoxide on K_{Ca} channels in vascular smooth muscle cells *Pflügers Arch* 434: 285-291.
- Winder CV and Winder HO (1933) The seat of action of sulfide on pulmonary ventilation *Am J Physiol* 105: 337-352.

Zanardo RCO, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G and Wallace J L (2006) Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. FASEB J 20: E1411- E1418.

Zhu YZ, Zhong JW, Ho P, Loke L, Zhu CY, Huang SH, Tan CS, Whiteman M, Lu J and Moore PK (2006) Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. J Appl Physiol 102: 261-268.

8. Lebenslauf

Name: Daniel Gjoncaj

Geboren: 7. September 1983

Geburtsort: Durres, Albanien

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1989 bis 1993 Besuch der Volksschule in Durres, Albanien

1993 bis 1997 Besuch der Hauptschule in Durres, Albanien

1997 bis 1999 Besuch des Gymnasiums „Naim Frasheri“ in Durres, Albanien

1999 bis 2002 Besuch des Oberstufenrealgymnasiums „Rudolf Steiner“ in
Wien

Juni 2002 Ablegung der Reifeprüfung

2002 bis 2010 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Sprachkenntnisse:

Albanisch (Muttersprache), Deutsch (Fließend), Englisch (Fließend), Italienisch (Fließend)

Sonstige Tätigkeiten

07/02 bis 10/02...Datenbearbeitung und Administration, Fernwärme Wien

10/05 bis 01/10.. Sekretariat, Kuratorium für Künstlerische und Heilende
Pädagogik

SS 2010 Tutorium für „Erste Hilfe“ am Department für Pharmakologie
und Toxikologie der Universität Wien

Sonstige Interessen:

Reisen, Kultur, Sport (Laufen, Fußball, Basketball)